

Biologie

Zielgene von Fusionsproteinen
in der akuten myeloischen Leukämie (AML)

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Thomas Cauvet
Münster
- 2003 -

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A des Universitätsklinikums der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster angefertigt.

Direktor: Prof. Dr. W. E. Berdel

Die Arbeit wurde betreut durch Prof. Dr. H. Pape Institut für Mikrobiologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

Dekan: Prof. A. Steinbüchel

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Pape
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Serve

Tag der mündlichen Prüfung: 09.12.2003; 15.12.2003

Tag der Promotion: 19.12.2003

Abkürzungsverzeichnis.....	4
Zusammenfassung.....	5
1. Einleitung.....	6
1.1 Die Akute myeloische Leukämie.....	6
1.2 Chromosomale Aberrationen.....	9
1.3 Die Translokation AML1-ETO.....	10
1.4 Der Retinoinsäure Rezeptor.....	13
1.5 Die Fusionsproteine mit dem Retinoinsäure Rezeptor alpha (RAR α).....	15
1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit.....	18
2. Material und Methoden.....	19
2.1 Lösungen und Medien.....	19
2.2 Geräte.....	22
2.3 Computerprogramme und Datenbanken.....	23
2.4 Zellkultur.....	23
2.5 Stammhaltung.....	25
2.6 DNA Isolierung.....	26
2.6.1 Isolierung chromosomaler DNA.....	26
2.6.2 Isolierung von Plasmid DNA.....	27
2.7 RNA Isolierung.....	29
2.8 Reverse Transkription.....	29
2.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	30
2.10 Gelelektrophorese.....	33
2.11 Ligation.....	34
2.12 Sequenzierung.....	35
2.13 Real-Time RT-PCR (TaqMan).....	36
2.14 Luziferase-Assay.....	37
2.15 Transformation von Zellen.....	38
2.15.1 Transformation von <i>E. Coli</i>	38
2.15.2 Transfektion eukaryotischer Zellen.....	40

2.16 Proteinisolierung.....	42
2.16.1 Westernblot Analyse.....	44
2.17 Kolonie-Assay.....	47
2.18 Vektoren und Oligonukleotide.....	49
3. Ergebnisse.....	53
3.1 Untersuchung des MEF Gens.....	59
3.1.1 Klonierung des MEF Gens.....	59
3.1.2 Kolonie-Assay des MEF Gens.....	61
3.2 Untersuchung des ID2 Promotors.....	62
3.3 Untersuchung des ID2 Gens.....	64
3.3.1 Klonierung des ID2 Gens.....	64
3.3.2 Kolonie-Assay des ID2 Gens.....	67
3.4 Untersuchungen zum Plakoglobin Gen (γ -Catenin).....	68
3.4.1 Klonierung des Plakoglobin Promotors.....	72
4. Diskussion.....	87
4.1 Die Regulation des ID2 Gens durch AML Fusionsproteine.....	88
4.2 Das MEF Gen und seine Regulation durch AML Fusionsproteine.....	92
4.3 Regulation des Plakoglobins durch die Fusionsproteine der AML.....	94
Ausblick.....	100
Referenzen.....	102
Lebenslauf.....	111
Danksagung.....	112

Abkürzungsverzeichnis

AML	akute myeloische Leukämie
APL	akute promyeloische Leukämie
ATRA	all-trans-Retinoinsäure
D3	Vitamin D3
del	Deletion
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur; Braunschweig
HHR	hydrophobic heptad repeat
inv	Inversion
mut	Mutation
NHR3	nervy homology region 3
NLS	nuclear localization signal
PCR	Polymerase chain reaction
PLZF	Promyelocytic leukemia zinc finger
PML	Promyelocytic leukemia
pRL	Plasmid Renilla Luziferase
RAR	Retinoic acid receptor
RARE	RAR specific regulatory element
RBP	Retinol-binding-protein
RXR	Retinoic X receptor
RXRE	RXR specific regulatory element
RHD	runt homolgy domain
TK	Thymidin-Kinase
TSA	Trichostatin A
TAF	transcription-activation factor
t(8;21)	Translokation der Chromosomen 8 und 21
Zn-F	zinc finger motive

Zusammenfassung

Die in der akuten myeloischen Leukämie auftretende maligne Transformation myeloischer Vorläuferzellen im Knochenmark lässt sich auf Mutationen und chromosomale Abberationen, wie z.B. Translokationen in den Stammzellen zurückführen. Bedingt durch diese genetischen Veränderungen in der Zelle kommt es im weiteren Verlauf zu einer veränderten Funktion der betroffenen Genprodukte. Von den bekannten Translokationen sind meist Transkriptionsfaktoren oder aber transkriptionelle Regulatoren betroffen, deren Fusion mit anderen Transkriptionsfaktoren oder Regulatoren zu einer veränderten Funktion führt, und sich damit auf die Expression nachgeschalteter Gene auswirkt.

Drei solcher Translokationen führen zu den Fusionsproteinen AML1-ETO, PML-RAR α und PLZF-RAR α , die alle drei Histondeacetylasen rekrutieren und so die Expression nachgeschalteter Gene reprimieren. Aufgrund des ähnlichen Funktionsmechanismus wurden mit Hilfe von Genchip Analysen und nachfolgender statistischer Auswertung Gene analysiert, die durch alle drei Fusionsproteine gleichsinnig reguliert werden.

Aus den gewonnenen Daten wurden sechzig regulierte Gene identifiziert, für die entsprechende Daten mittels real Time RT-PCR verifiziert wurden. Der Großteil der gefundenen Gene wurden in ihrer Expression reprimiert, allerdings wurden auch Gene gefunden die durch die Fusionsproteine induziert wurden. Im Anschluss an die Bestätigung der Genchip Daten in der real Time RT-PCR wurden drei Gene ausgesucht, die genauer untersucht wurden. Hierbei handelt es sich um ID2 (inhibitor of differentiation) und MEF (myeloid elf 1 like factor), die durch die Fusionsproteine reprimiert werden, sowie um Plakoglobin (γ -Catenin) das durch die Fusionsproteine stärker exprimiert wurde.

Für die weiteren Untersuchungen wurde die cDNA von ID2 und MEF in den pCDNA3.1 Expressionsvektor kloniert und Kolonie Assay durchgeführt. Während für das MEF Gen im Kolonie Assay keine veränderte Kolonienzahl ermittelt wurde, zeigte das Ergebnis für das ID2 Gen eine verringerte Kolonienzahl. Ebenso wurden die Promotorsequenzen des ID2 Gens sowie von Plakoglobin in den pGL3-Basic Luziferase Vektor kloniert um zu ermitteln ob die Regulation durch die Fusionsproteine innerhalb des Promotors stattfindet. Bei dieser Untersuchung konnte ein Sequenzbereich lokalisiert werden, der in der Regulation durch das Fusionsprotein involviert ist.

1. Einleitung

1.1 Die akute myeloische Leukämie (AML)

Die akute myeloische Leukämie entsteht durch eine maligne Transformation myeloischer Stammzellen des Knochenmarks die sich durch Proliferation und einen Differenzierungsblock auszeichnen das zu einer Akkumulation unreifer Blasten führt. Bei dieser klonalen Erkrankung myeloischer Vorläuferzellen kann ein Reifungsstopp auf unterschiedlicher Ebene vorliegen, wobei man bei einem Infiltrationsgrad unreifer Vorläuferzellen (Blasten) des Knochenmarks von 30 % oder mehr von einer AML spricht. In der Folge kommt es zur Knochenmarkinsuffizienz mit Anämie, Thrombozytopenie und Neutropenie. Klinisch führt dies bei den Patienten zu verstärkter Müdigkeit und Schläppheit, verstärkter Blutungsneigung und vermehrter Infektion.

Die Ursachen für die Entstehung einer Leukämie sind noch nicht eindeutig geklärt. Es können jedoch bekannte Faktoren, die das Risiko einer Leukämieentstehung erhöhen, aufgeführt werden. Dazu gehört die Einwirkung ionisierender Strahlung (z.B. bei Atombombenexplosionen, bei Reaktorunfällen wie Tschernobyl sowie bei der Strahlentherapie). Das Leukämierisiko verdoppelt sich bei einer Ganzkörperdosis von 1 Gy bei Erwachsenen und bereits bei 30 mGy bei Feten. Ebenfalls zu nennen sind Chemikalien wie z.B. Zytostatika, Benzol, Lost und andere. Einige Viren z.B. das Humane T-cell Leukämie Virus I (HTLV I), das eine T-Zell Leukämieform, die besonders bei Erwachsenen in SüdJapan und der Karibik auftritt, verursachen kann. Ein erhöhtes Risiko für Leukämieerkrankungen besteht auch bei bestimmten Syndromen mit Erbgutveränderungen, wie z.B. bei der Trisomie 21 (Down-Syndrom). Da eine genetische Veranlagung besteht, haben Personen mit enger Blutsverwandtschaft (z.B. eineiige Zwillinge) zu einem Leukämiepatienten, ein erhöhtes Risiko ebenfalls eine Leukämie zu entwickeln.

Für einige Leukämieformen existieren charakteristische Mutationen. Oft liegen balancierte Translokationen vor, bei denen es sich um Strangbrüche der Chromosomen handelt deren Enden an jeweils andere Chromosomen fusioniert sind. Durch diese Translokationen entstehen sogenannte Fusionsproteine, und dadurch in der Zelle eine neue Funktion, in die häufig Transkriptionsfaktoren involviert sind. Es wird angenommen, dass die Funktion dieser Fusionsproteine wesentlich an dem AML typischen Differenzierungsblocks beteiligt sind (Crans and Sakamoto 2001).

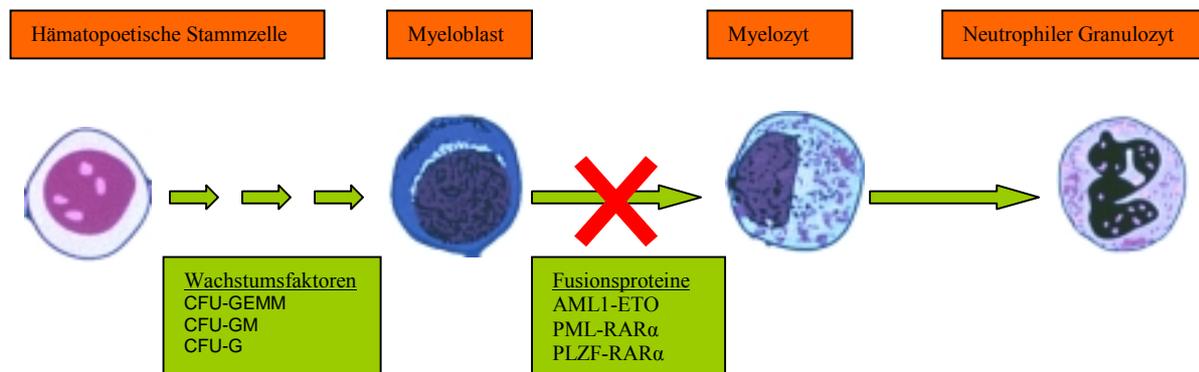


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Granulopoese. Durch die Fusionsproteine kommt es zu einem Differenzierungsstopp und Anhäufung von Blasten im Knochenmark.

Die akute myeloische Leukämie kann in allen Altersstufen vorkommen, tritt aber am häufigsten bei Erwachsenen auf und stellt damit die häufigste akute Leukämie des Erwachsenen dar. Die AML zeigt sich als eine heterogene Gruppe mit unterschiedliche Subtypen. Die Diagnose wird auf der Grundlage zytomorphologischer und zytochemischer Untersuchungen an Knochenmark und Blutaussstrichen gestellt. Abhängig vom jeweiligen Stadium der Hämatopoese, in dem die maligne Transformation stattfindet, existieren unterschiedliche Subtypen der AML, die nach Vorschlägen der French-American-British-Cooperative-Group (FAB) (Nosslinger, Reisner et al. 2001; Bennett, Brunning et al. 2002) in die Subtypen M0-M7 unterteilt werden. In Revisionen der FAB-Klassifikation 1985, der MIC (Morphologic-Immunologic-Cytogenetic)-Klassifikation 1986 und einem weiterführenden Workshop 1990 wurden erweiterte Erkenntnisse der Immunphänotypisierung, Zytogenetik und Molekulargenetik in der Einteilung der AML berücksichtigt

Tabelle 1: Übersicht über die akute myeloische Leukämie nach der FAB Klassifikation

FAB	Zytogenetik	Vorkommen	Morphologie	Auer-Stäbchen
M0	Unspezifisch	8%	>30% Blasten	
M1	t(8;21), inv(3)	15%	>90% Blasten >3% Peroxidase / Sudan Schwarz	61%
M2	t(8;21), t(15;17)	25%	zwischen 30% und 89% Blasten	nicht gebündelt
M3	t(15;17)	10%	>30% Blasten, Hypergranulation der Promyelozyten	Fagott-Zellen
M4	inv 16	25%	>30% Blasten,	
M5	t(8;16), t(9;11)	10%	+/- 80% monozytoiden Monoblasten	selten
M6	del (5), del (7)	3-4%	≥ 30% Blasten	selten
M7	inv (3), t(19;22) t(1;22), Trisomie 21	2-4%	>30% Blasten Megakaryozyten CD41 und CD61 positiv	

Im Jahr 2000 wurde die FAB-Klassifikation der AML durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) novelliert (Germing, Gattermann et al. 2000; Vardiman, Harris et al. 2002). Diese Veränderungen betreffen den zur Diagnose der AML notwendigen Blastenanteil im Knochenmark, der von 30% auf 20% gesenkt wurde. Der zweite Ansatz betrifft die bereits gut charakterisierten zytogenetischen Veränderungen t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22), t(16;16)(p13;q22) und t(15;17)(q22;q12). Hierdurch kann nach der WHO Klassifikation unabhängig vom Blastenanteil eine AML diagnostiziert werden.

Tabelle 2: Zusammenfassung immunologische Oberflächenmarker der AML-Subtypen

Oberflächenmarker	FAB-Subtypen								
	M0	M1	M2	M3	M4	M5a	M5b	M6	M7
CD7	+/-	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-
CD11c	-	-	-	-	+/-	+/-	+	-	-
CD13	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+/-
CD14	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	-	-
CD15	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	-	-
CD19	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-
CD33	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-
CD34	+	+	+/-	-	+/-	-	-	-	-
CD41a	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CD42b	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CD45	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-
CD61	-	-	-	-	-	-	-	-	+
CD68	-	-	-	+	+/-	+	+	-	-
CD71	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Gly A	-	-	-	-	-	-	-	+	-
HLA-DR	+	+	+	-	+	+	+	+/-	+/-
MPO	+/-	+/-	+	+	+	+	+/-	-	-
TdT	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-	-

Mit Hilfe der Immunphänotypisierung lassen sich nahezu alle Fälle einer akuten Leukämie der myeloischen oder lymphatischen Reihe zuordnen. Eine Zusammenstellung der immunologischen Befunde findet sich in Tabelle 2 (Seeber 2003)

1.2 Chromosomale Aberrationen

Wie bereits erwähnt, ist die akute myeloische Leukämie eine sehr heterogene Erkrankung, die mit sehr vielen und unterschiedlichen Aberrationen und Mutationen assoziiert ist. Von großer Bedeutung war die Entdeckung von chromosomalen Translokationen, die zu einem besseren Verständnis der genetischen Veränderungen in einer Leukämiezelle geführt hat. Neben der Akkumulation von Mutationen in Onkogenen und/oder Tumorsuppressor-Genen, die häufig zum Verlust der Koordinierung zwischen Proliferation und Differenzierung führt, tragen hierzu auch chromosomale Aberrationen bei, die zu einer Expression eines Fusionsproteins führt, wodurch die eigentliche Funktion des Proteins der Zelle verändert wird (Rabbitts 1994). Die erste chromosomale Translokation der akuten myeloischen Leukämie die identifiziert wurde, war eine Translokation zwischen den Chromosomen 8 und 21. In diese Translokation ist das AML1 (CBFA2) Gen involviert, ein Transkriptionsfaktor, der auf Chromosom 21 lokalisiert ist. Zusammen mit dem Transkriptionsfaktor ETO auf Chromosom 8 bildet es das Fusionsprotein AML1/ETO t(8;21) und wurde erstmals 1991 kloniert (Miyoshi, Shimizu et al. 1991; Rowley 2000).

Um jedoch das vollständige Bild einer akuten Leukämie auszulösen, sind in der Regel mehrere genetische Ereignisse notwendig. So kann das Auftreten des Fusionsproteins AML1-ETO assoziiert sein mit dem Verlust des X- bzw. des Y-Chromosoms, einer Trisomie 4 oder anderen Translokationen bzw. Mutationen (Yuan, Zhou et al. 2001; Nishii, Usui et al. 2003).

In einigen Fällen lassen sich bestimmte chromosomale Anomalien einem bestimmten Leukämie Subtyp zuordnen und können als Prognosemarker verwendet werden. Die spezifischen Chromosomenaberrationen t(8;21) (FAB M2), t(15;17) (FAB M3) und inv16 (FAB M4Eo) sind mit einer günstigen Prognose assoziiert, wohin gegen unspezifische Aberrationen der Chromosomen 5,7,11 und komplexe Chromosomenanomalien prognostische eher ungünstig (Rowley 2000). Die Tabelle 3 zeigt eine Zusammenstellung der wichtigsten Aberrationen mit den daraus resultierenden Fusionsproteinen sowie eine Zuordnung zu den FAB-Subtypen (Scandura, Boccuni et al. 2002).

Tabelle 3: Chromosomen Anomalien und Mutationen bei AML mit Zuordnung zu den FAB-Subtypen.

Translokation	Fusionsprotein/Mutation	Morphologie
t(8;21)(q22;q22)	AML1/ETO	AML M1 (8-12%), M2(18-40%)
t(16 ;21)(q24 ;q22)	AML1/MTG16	variable sekundäre AML, auch in de novo MDS
t(3 ;21)(q26 ;q22)	AML1/EVI1	variable sekundäre AML, üblicherweise in blastischer CML, in MDS und t-AML
Inv(16)(p13;q22)	CFB b/MYH11	AML M4Eo selten M4, M5, M2
del(16)(q22)	CBF b?	AML M4, M2 signifikanter Unterschied zu Inv(16)
t(15 ;17)(q22 ;q12)	PML/RAR α	AML M3
t(11 ;17)(q23 ;q12)	PLZF/RAR α	primäre AML M3
t(11 ;17)(q13 ;q12)	NuMA/RAR α	AML M3
t(5 ;17)(q35 ;q12)	NPM/RAR α	AML M3
t(17 ;17)(q11 ;q12)	STAT5b/RAR α	AML M3
t(4 ;11)(q21 ;q23)	MLL/AF4	primäre oder sekundäre AML, ALL
t(6 ;11)(q27 ;q23)	MLL/AF6	AML M4 oder M5, t-ALL
t(9 ;11)(p22 ;q23)	MLL/AF9	AML M4 oder M5 sekundäre AML, t-AML
t(11 ;19)(q23 ;p13 ;3)	MLL/ENL	ALL, AML M4 or M5
t(11 ;19)(q23 ;p13.1)	MLL/ELL	AML M4 oder M5,
t(11 ;19)(q23 ;p13.3)	MLL/EEN	AML M4 oder M5;
t(11 ;16)(q23 ;p13)	MLL/CBP	AML M4 oder M5
t(11 ;22)(q23 ;q13)	MLL/p300	sekundäre AML, t-AML
t(7 ;11)(p15 ;p15)	NUP98/HOXA9	AML M2 or M4;
t(2 ;11)(q31 ;p15)	NUP98/HOXD13	sekundäre AML entstanden aus MDS, CML
t(1 ;11)(q24 ;p15)	NUP98/PMX1	AML M2; sekundäre AML (t-AML),
inv(11)(p15;q22)	NUP98/DDX10	sekundäre AML (t-AML) oder blastische CML
t(6 ;9)(p23 ;q34)	DEK/CAN	AML M2 or M4
t(8 ;16)(p11 ;p13)	MOZ/CBP	AML M4 or M5
t(9 ;22)(q34 ;q11)	BCR/ABL	AML M1 or M2; CML
t(3 ;3)(q21 ;q26)	EVI-1	Megakaryozytisch, sekundäre AML aus MDS
inv(3)(q21;q26)	EVI-1	
t(16 ;21)(p11 ;q22)	TLS/ERG	variabel
del(17p)	p53 Mutationen	

1.3 Die Translokation AML1-ETO

Der Transkriptionsfaktor AML1 (auch PEBP2A2 oder RUNX1 genannt) wird aufgrund seiner DNA bindenden Domäne auch core-binding-factor (CBFA2) genannt (Speck and Terryl 1995). Es bindet mit der runt Domäne (RHD) an eine spezifische core Enhancer Sequenz (TGT/cGGT), deren Namensgebung auf ihrer Homologie zum Drosophila pair-rule Gen runt beruht (Meyers, Downing et al. 1993). Zusammen mit einer zweiten Untereinheit CBF β bildet AML1 das Heterodimer AML1/CBF β wodurch schließlich die Affinität zur Bindung an die DNA erhöht wird. Der Heterodimere Transkriptionsfaktor AML1/CBF β

reguliert die Expression hämatopoetisch spezifischer Gene z.B. IL3, CSF1-Rezeptor, Myeloperoxidase und den Wachstumsfaktor GM-CSF (Downing 2001). AML1 ist, wie heute bekannt, nicht nur Ziel des chromosomalen Rearrangements zur Bildung des Fusionsproteins AML1/ETO, sondern ist ebenfalls Zielgen unterschiedlicher Translokationen zur Bildung weiterer chimärer Proteine (siehe Tabelle 3). Auch CBF β ist Ziel chromosomaler Translokationen, wie z.B. die inv16 (p13;q22) und bildet hier das Fusionsprotein CBF β /MYH11. AML1 wird normalerweise in hämatopoetischen Zellen exprimiert, allerdings kann es ebenfalls in Nervengewebe, Skelettmuskel und den Reproduktionsorganen (Testis, Ovar) gefunden werden (Tenen, Hromas et al. 1997).

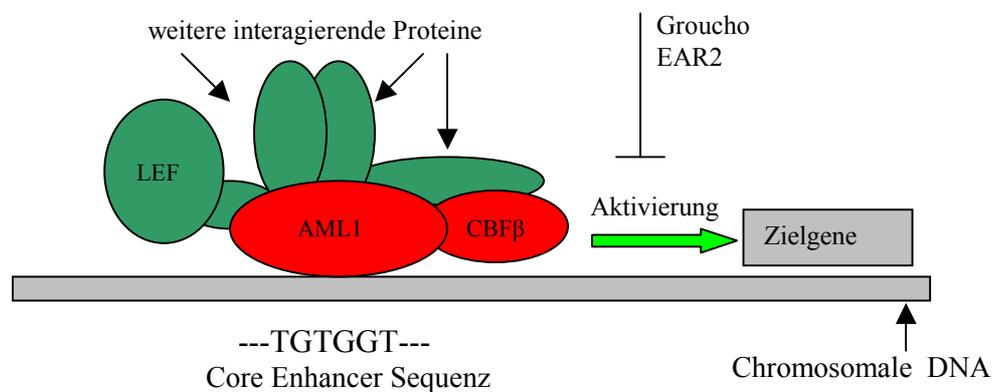


Abbildung 2: Der AML1/CBF β Transkriptionsfaktor Komplex bindet an die Core Enhancer Sequenz um die Transkription zu initiieren. Die weiteren bindenden Proteine unterscheiden sich je nachdem welcher Promotor oder Enhancer involviert ist. Die Komplexbildung mit AML1/CBF β (LEF) führt normalerweise zu einer transkriptionellen Aktivierung, bei einer Komplexbildung mit anderen Proteinen wie Groucho Proteinen oder Ear2 konvertiert der Komplex allerdings zu einem transkriptionellen Repressor (Downing 1999).

Der transkriptionelle Regulator ETO (MTG8), dessen Gen auf Chromosom 8 liegt, ist ebenfalls in die Translokation t(8;21) (q22,q22) involviert ist und bildet zusammen mit AML1 das Fusionsprotein. Das resultierende chimäre Protein AML1/ETO enthält die N-terminale Region von AML1 und fast das komplette ETO Protein (Nisson, Watkins et al. 1992; Kozu, Miyoshi et al. 1993; Miyoshi, Kozu et al. 1993; Zhang, Hug et al. 2001). Der transkriptionelle Regulator ETO ist ein nukleäres Zink-Finger Protein, bei dem es bislang keine experimentellen Hinweise dafür gibt, dass es selbst direkt an die DNA binden kann (Downing

1999). Untersuchungen haben gezeigt, dass der transkriptionelle Regulator ETO ein humanes Homolog des Drosophila Gens *nervy* ist (Feinstein, Kornfeld et al. 1995). Weitere Arbeiten identifizierten MTGR1 und MTG16 als zwei weitere Mitglieder der ETO Familie (Kitabayashi, Ida et al. 1998), die selbst auch in Translokationen involviert sein können (z.B. MTG16 in der Translokation t(16/21)). Die Mitglieder der ETO Familie bilden Homo- und Heterodimere und interagieren mit nukleären Co-Repressoren wie Sin3a und N-CoR die aktive Histondeacetylasen (HDAC) binden. In diesem Komplex spalten die HDAC Acetylgruppen von Lysinresten der Histone im Nukleosom ab, was zu einer Konformationsänderung im Chromatin führt. Diese Konformationsänderung bewirkt, dass die DNA unzugänglich für den basalen Transkriptionsapparat wird (Grunstein 1997)(siehe Abbildung 4).

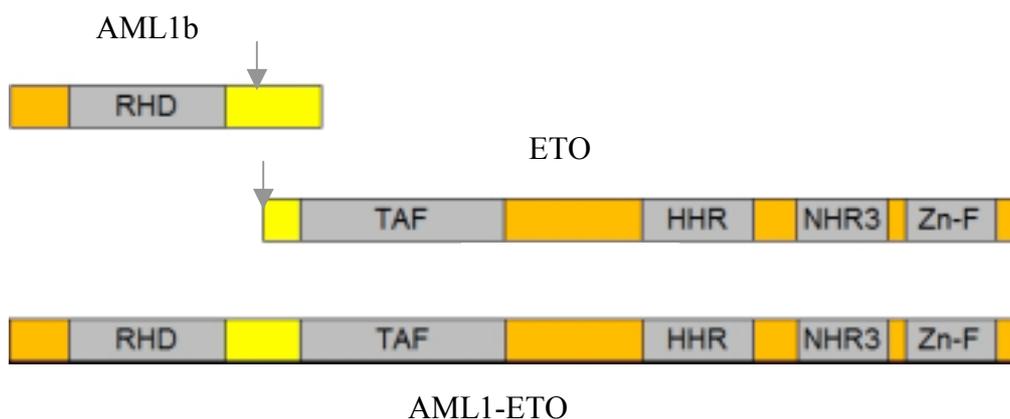


Abbildung 3: AML1b, ETO und das resultierende Fusionsprotein AML1-ETO. Die jeweiligen Bruchpunkte sind mit Pfeilen markiert. Es können somit zwei Fusionsproteine entstehen, das AML1-ETO und das ETO-AML1. Bei dem Fusionsprotein AML1-ETO sind 177 Aminosäuren der N-terminalen Region des AML1b Proteins fusioniert mit dem fast kompletten ETO Protein (Erickson, Gao et al. 1992).

RHD = runt homology domain; TAF = transcription-activation factor; HHR = hydrophobic heptad repeat; NHR3 = nervy homology region 3; Zn-F = zinc finger motif

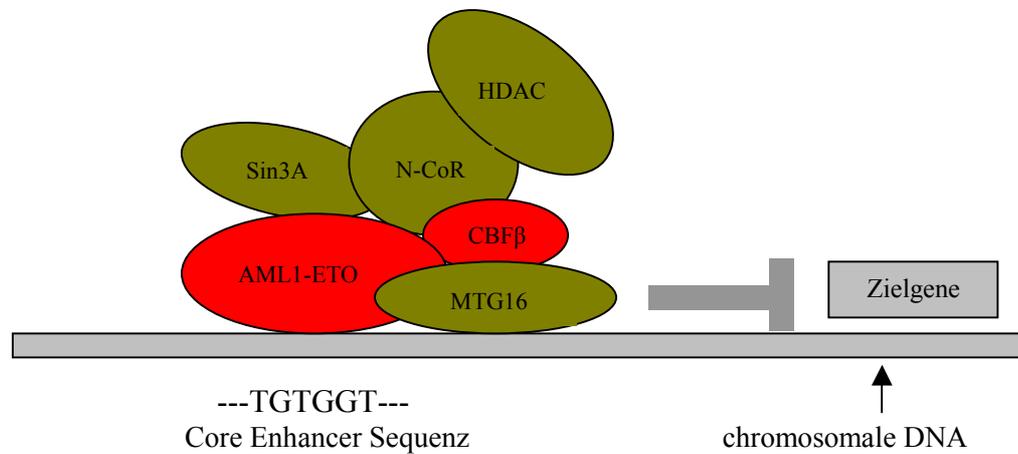


Abbildung 4: Die Bindung an die DNA durch das Fusionsprotein AML1-ETO bewirkt, dass die Zielgene nicht mehr exprimiert werden (vergleiche mit Abbildung 2). Die DNA bindende Domäne befindet sich auf dem AML1 Gen, während die Repressoreigenschaften von ETO noch vollständig vorhanden sind. ETO bildet hier mit MTG16 ein Heterodimer (Downing 1999).

1.4 Der Retinoinsäure Rezeptor

Vitamin A (Retinol) ist ein Derivat der Retinoinsäure, das in verschiedenen essentiellen physiologischen Prozessen wie der Hämatopoese, während der Differenzierung, der Knochenentwicklung, dem Sehen oder aber der Regulierung spezifischer Zielgene in der Zelle von Bedeutung ist. Retinol kann nicht de novo synthetisiert werden (Collins, Tsai et al. 1996; Collins and Mao 1999), und muss daher mit der Nahrung aufgenommen werden (z.B. Carotinoide). Es wird in der Leber gespeichert und von dort im Blut als Proteinkomplex mit dem Retinol-bindenden Protein (RBP) in den Geweben verteilt. Nach Aufnahme in die Zelle wird es von einem zellulären Retinol-bindenden Protein (CRBP) gebunden und dort auf einen Retinoid Rezeptor übertragen. Retinol kann dort in einem oxidativen Prozess zu Retinal umgesetzt werden, mit dem es in einem Gleichgewicht steht. Retinal kann seinerseits in einem irreversiblen Prozess zu all-trans-Retinoinsäure (ATRA) umgewandelt werden (Sacchi, Russo et al. 1997).

Retinoinsäuren nehmen eine Schlüsselrolle in der myeloischen Differenzierung ein (Melnick and Licht 1999) und binden an Rezeptoren, von denen bislang zwei Familien (Giguere, Ong et al. 1987; Leid, Kastner et al. 1992) charakterisiert wurden. Bei der ersten Familie handelt es sich um die Retinoinsäure Rezeptoren Typ Alpha, Beta und Gamma sowie deren Isoformen $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ bis $\beta 4$, $\gamma 1$ und $\gamma 2$, die durch ATRA und einem Stereoisomer von ATRA der 9-cis Retinoinsäure, aktiviert werden können (de The, Tiollais et al. 1990; Mendelsohn, Lohnes et al. 1994). Die zweite Familie ist die RXR Familie mit ihren Isoformen Alpha, Beta und Gamma (Mangelsdorf, Borgmeyer et al. 1992), wobei RXR α eine hohe Affinität zu dem Stereoisomer 9-cis Retinoinsäure zeigt (Kliwer, Umesono et al. 1992; Lohnes, Mark et al. 1994). Das RAR α Protein kann in sechs Regionen (A-F) und insgesamt zwei Domänen (AF-1, AF-2) eingeteilt werden. Die AF-1 Domäne befindet sich N-terminal in der A/B Region des Proteins, ist Liganden-unabhängig und fungiert als transkriptioneller Aktivator abhängig vom Promotor. Da es an unterschiedlichen Promotoren binden kann, existieren für RAR α zwei unterschiedliche A Regionen (A1 und A2). Die C Region des RAR α Proteins ist ein hoch konservierter Bereich innerhalb der Familie der Retinoinsäure Rezeptoren und enthält zwei Zink-Finger Motive. In diesem Bereich befindet sich die DNA bindende Domäne durch die RAR α an die RARE (retinoic acid response elements) unterschiedlicher Promotoren binden kann.

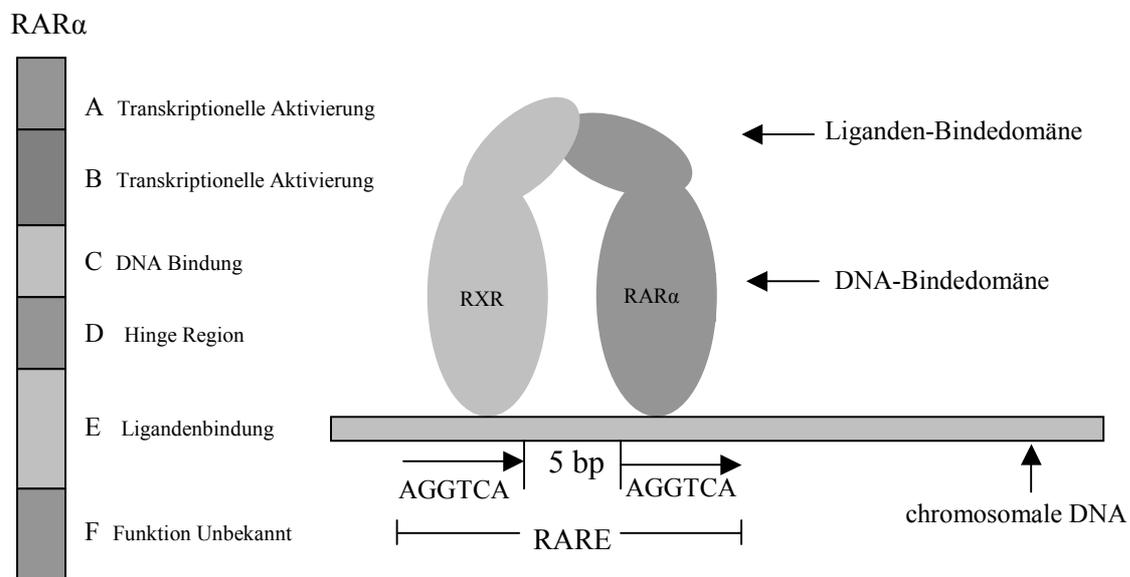


Abbildung 5: Die Abbildung zeigt die Bildung des Heterodimers RXR-RAR α . Hier ist das RARE gezeigt, bei dem die aus sechs Basenpaaren bestehenden direct repeats durch ein aus fünf Basenpaare bestehenden Spacer getrennt sind (Melnick and Licht 1999; Collins 2002).

Die RARE bilden eine aus Gruppen von sechs Basenpaaren bestehende Consensus-Sequenz AGGTCA (direct repeats, inverted repeats, everted repeats), die durch eine Vielfalt sich wiederholender Strukturen getrennt sein können (Collins 2002). Die Region E des Retinoinsäure Rezeptors ist ebenfalls ein konservierter Bereich innerhalb der Familie. Dieser Bereich ist zuständig für die Bildung des Heterodimers ebenso wie für die Ligandenbindung, die Hormonerkennung und die spezifische und selektive physiologische Antwort. Für die Region F, die in manchen Rezeptoren der Retinoinsäure Rezeptor Familie nicht vorhanden ist, wurde bislang keine Funktion beschrieben (Melnick and Licht 1999).

1.5 Die Fusionsproteine mit Retinoinsäure Rezeptor alpha (RAR α)

Der Retinoinsäure Rezeptor RAR ist in der akuten Promyelozyten Leukämie (APL) in verschiedenen Translokationen und damit in die entstehenden Fusionsproteine involviert. Bei einer großen Anzahl von Patienten (>90%) mit einer akuten Promyelozyten Leukämie ist das RAR α Protein, das auf dem Chromosom 17q21 lokalisiert ist, fusioniert mit dem PML Gen auf Chromosom 15q22, was zur Bildung des chimären Proteins PML-RAR α t(15;17) führt (Goddard, Borrow et al. 1991). Das PML Gen umfasst auf dem Chromosom 15 etwa 35 kb und enthält 9 Exons. Durch alternatives Spleißen entstehen unterschiedliche Transkripte (4 kb, 3 kb oder 2,1 kb) mit etwa 20 Isoformen. Allerdings exprimieren die meisten Zellen die gleichen Isoformen (Chang, Lu et al. 1992; Grignani, Fagioli et al. 1994). Außer dem Fusionsprotein PML-RAR α entsteht in etwa 70 bis 80% der akuten promyeloischen Leukämie (APL) auch das entsprechende Gegenstück der Translokation t(15;17) das Fusionsprotein RAR α -PML (Zaccaria, Valenti et al. 2002). Bei dem PML Gen können unterschiedliche Bruchpunkte beschrieben werden, die jeweils ein in der Länge unterschiedliches Konstrukt bilden. Der häufigste Bruchpunkt ist bcr3 (breakpoint cluster region 3) der nahe dem 5'Ende liegt und die Exons 1-3 des PML Gens mit dem Exon 3 des RAR α Gens fusioniert. Das Fusionsprodukt bildet die kurze Form des Fusionsproteins PML-(S)-RAR α . Bcr1 ist mehr zum 3'Ende gelegen und fusioniert die Sequenzen von Exon 5 und 6 mit dem RAR α Gen, dessen Fusionsprodukt die lange Form PML-(L)-RAR α bildet. Der Bruchpunkt von bcr2 betrifft das Exon 6 des PML Gens und führt zu einer intermediären Länge des PML-(V)-RAR α . Zusammengefasst exprimieren 70% der Patienten mit einer APL das PML-(L)-RAR α , 20% das PML-(S)-RAR α und 10% die PML-(V)-RAR α Form (Fenaux and Chomienne 1996).

Das PML Protein hat eine Struktur mit unterschiedlichen Domänen (siehe Abb. 6). In einer Cystein reichen Domäne mit drei Zinkfinger ähnlichen Strukturen bildet die erste Struktur eine Ringfinger Struktur mit einem Zink bindenden Motiv, das wahrscheinlich an einer Protein- Protein Interaktion beteiligt ist. Zwei weitere Strukturen sind B-Boxen die in der Bildung von sogenannten „nuclear bodies“ involviert sind (durch Interaktion mit anderen Proteinen) (Melnick and Licht 1999; Ferbeyre, de Stanchina et al. 2000). Die anschließende Region ist die helikale coiled-coil Region mit unterschiedlichen Funktionen wie der Bildung von Heterodimeren oder auch der Beteiligung an der Bildung von nuclear bodies. An diese schließt sich eine weitere Region, die mit NLS (nuclear localization signal) bezeichnet ist und für die biologische Aktivität des Proteins notwendig ist, sowie eine weitere Serin / Prolin reiche Region mit bisher unbekannter Funktion an.

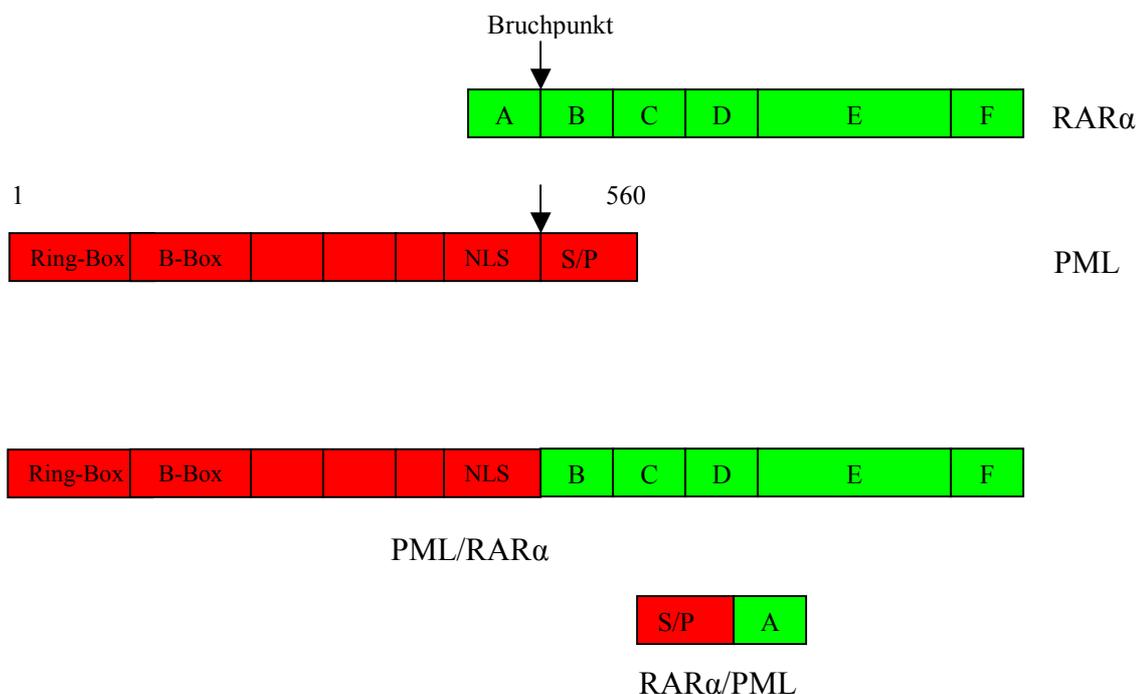


Abbildung 6: Darstellung der Proteine PML und RARα und Bildung der resultierenden Fusionsproteine PML-RARα und RARα-PML. Unterschiedliche Bruchpunkte innerhalb des PML Gens können zur Bildung einer langen und einer kurzen Form des Fusionsproteins PML-RARα führen (Melnick and Licht 1999).

In Zusammenhang mit dem RARα Gen können weitere chromosomale Anomalien genannt werden, die aber in Ihrem Auftreten selten sind. Zu nennen sind hier die Translokation t(11q13;17) mit dem Fusionsprotein NUMA/RARα (nuclear mitotic apparatus), die

Translokation t(5/17)(q35;q21) mit dem Fusionsprotein NPM/RAR α (Nucleophosmin) sowie die Translokation t(17q21) STAT5b/RAR α (Guidez, Ivins et al. 1998; Hummel, Zhang et al. 2002). Als eine weitere und ebenfalls als selten anzusehende chromosomale Anomalie wurde das PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger) Gen mit dem RAR α Gen in der Translokation t(11;17)(q23;q21) identifiziert (Chen, Zelent et al. 1993). Das PLZF Protein wird in frühen hämatopoetischen Zellen exprimiert und reguliert Gene, die in die Proliferation und Differenzierung der Zellen involviert sind (z.B. cyclinA2, c-myc) (Mistry, Pedersen et al. 2003).

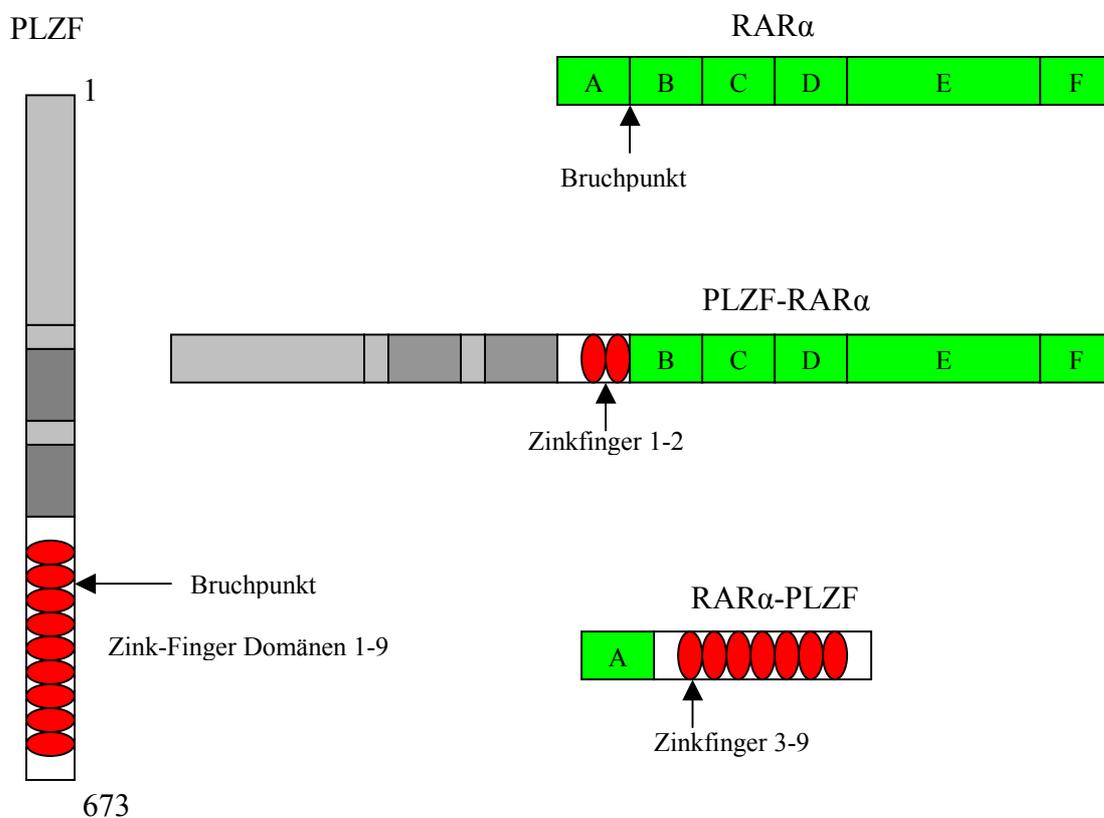


Abbildung 7: Funktionelle Domänen des PLZF Gens und Darstellung der resultierenden Fusionsproteine PLZF/RAR α und RAR α /PLFZ in der Translokation t(11,17)(q23;q21) (Melnick and Licht 1999).

Das PLZF Gen kodiert für ein aus 673 Aminosäuren bestehenden Transkriptionsfaktor mit neun „Krüppel“ ähnlichen C₂H₂ Zinkfinger Domänen in der C-terminalen Region des Proteins. Die N-terminale Region des Proteins ist die BTB/POZ Domäne (Broad Complex, tramtrack, Brick a Brac / Pox virus and Zinc finger) (Melnick and Licht 1999). Diese Region ist für

unterschiedliche Aufgaben zuständig wie z.B. die Bindung von Co-Faktoren wie N-CoR, SMRT und HDAC's. Physikalische Untersuchungen des PLZF Proteins zeigten eine Dimerbildung des Proteins, die ebenfalls über die BTB/POZ Domäne funktioniert. Bei der Bildung der Fusionsproteine PLZF/RAR α und RAR α /PLFZ können bedingt durch unterschiedliche Bruchpunkte auf dem PLZF Gen die ersten beiden oder aber die ersten drei Zinkfinger Motive auf dem Fusionsprotein PLZF/RAR α lokalisiert sein (Hummel, Zhang et al. 2002).

1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die vorgestellten Fusionsproteine AML1-ETO, PML-RAR α und PLZF-RAR α rekrutieren Co-Repressormoleküle wie N-CoR, mSin3A, SMRT und Histondeacetylasen (HDAC). Gene, die normalerweise durch die Transkriptionsfaktoren AML1b, PML oder PLZF reguliert werden, können durch Bindung der HDAC's an die entsprechenden Fusionsproteine abgeschaltet werden. Diese gemeinsame pathologische Wirkungsweise der Fusionsproteine AML1-ETO, PML-RAR α und PLZF-RAR α begründet die Frage nach gemeinsamen Zielgenen dieser Fusionsproteine.

In der vorliegenden Arbeit sollten Zielgene der Fusionsproteine AML1-ETO, PML-RAR α und PLZF-RAR α identifiziert und weiter analysiert werden. Die Fusionsproteine regulieren Zielgene entweder durch direkte Bindung der DNA-Binde-Domäne des AML1b-, PML- oder PLZF-Anteils an die DNA, oder aber über die Bindung an andere Transkriptionsfaktoren. Daher sollten von den identifizierten Zielgenen auch Promotorsequenzen kloniert werden, um so mögliche regulatorische Sequenzen und Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die die Wirkung der Fusionsproteine vermitteln.

2. Material und Methoden

2.1 Lösungen und Medien

Für die Kultivierung von Zelllinien wurden je nach Zelllinie unterschiedliche Medien verwendet.

Dulbecco's Modified Eagle Medium

ohne Na-Pyruvat

+ 4500 mg/l Glucose

+ Pyridoxin HCl

Katalog Nr. 41965-039

Firma: GIBCO BRL

Dieses Medium wurde für Adhärente Zelllinien verwendet.

RPMI 1640 Medium

ohne L-Glutamin

Katalog Nr. 21875-034

Firma: GIBCO BRL

RPMI 1640 Medien sind angereicherte Formulierungen und für zahlreiche Säugerzellen geeignet. Ursprünglich wurden sie für Suspensionskulturen und Monolayer-Kulturen humaner Leukämiezellen entwickelt (GIBCO BRL).

RPMI 1640 Medium

+ 20 mM HEPES

ohne L-Glutamin

ohne NaHCO₃

Katalog Nr. F 1235

Firma: Biochrom AG, Berlin

Iscove's Modifiziertes Dulbecco's Medium (IMDM)

+ L-Glutamin

+ 25 mM HEPES

Katalog Nr. 3076376

Firma: GIBCO BRL

Trypsin (10x)

Firma Bio Whittaker Europe, Belgien

Das Trypsin wurde 1:10 mit PBS verdünnt.

Penicillin / Streptomycin (100x)

10000U / 10 mg /ml in Saline

Firma PAA Laboratories GmbH, Österreich

Die Lösung wurde in 5 ml Aliquots abgefüllt und bei -20°C eingefroren. Für eine Flasche Zellkultur Medium wurde ein Aliquot verwendet.

Fötales Kälber Serum (FCS)

Firma Biochrom AG, Berlin

Das FCS wurde für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert und in 50 ml Falcontubes aliquotiert.

WEHI

Das WEHI ist ein Zellüberstand der WEHI 3B Zelllinie, die ständig in Kultur gehalten wird. Für die Kultivierung der Zelllinie wurde das IMDM Medium mit 10% FCS, Penicillin/Streptomycin und β -Mercaptoethanol ($2,5 \cdot 10^{-5}$ M) verwendet. Die Zellen wurden abzentrifugiert (400g), der Überstand sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

G418 (Neomycin)

Für die Selektion von transfizierten Zellen wurde dem Medium G418 zugegeben. Dies wurde in Pulverform zu 5 g von der Firma CalBioChem bezogen mit 100 ml ddH₂O vermischt und zu 5 ml Aliquots (50 mg/ml) bei -20°C eingefroren. Pro Zellkulturflasche (20 ml Medium) wurden 300-350 μl der G418 Lösung verwendet.

Stammlösungen

Ampicillin	100 mg / ml gelöst in Aqua bidest.; sterilfiltriert bei -20 °C gelagert; Arbeitskonzentration: 0,1 mg / ml
dNTP's	Guanin, Adenin, Thymin, Cytosin gelöst in A. bidest. in einer Konzentration von je 2 mM; Arbeitskonzentration: 0,2 µmol / µl
Ethidiumbromid	10 mg / ml gelöst in A. demin. bei 4 °C lagern; Färbebad: 10 µg / ml in TAE-Puffer
Glucose	20 mg / ml gelöst in A. bidest.;
IPTG	200 mg / ml gelöst in A. bidest.; sterilfiltriert bei -20 °C gelagert. Arbeitskonzentration: 40 µg / ml
Proteinase K	10 mg / ml gelöst in Lysis-Puffer; Arbeitskonzentration: 100 µg / ml
RNAse A	10 mg / ml gelöst in A. bidest.; 10 min bei 100 °C aufgeköcht und bei 4 °C gelagert;
SDS	10 % SDS gelöst in A. demin.;
Thiamin	10 mg / ml gelöst in ddH ₂ O Arbeitskonzentration: 10 µg / ml Thiamin wurde obligatorisch bei der Transformation von E. Coli eingesetzt.
X-Gal/Bluo-Gal	20 mg / ml gelöst in Dimethylformamid oder DMSO; lichtgeschützt gelagert bei -20 °C; Arbeitskonzentration: 40 µg / ml
M-MLV RT (Promega)	Reverse Transkriptase , RNAse H(-) point mutated

2.2 Geräte

Für die Durchführung der Versuche wurden unter anderem folgende Geräte verwendet.

Autoklaven	Truttnauer 2540EL, Tischautoklav Truttnauer 3870ELV
Inkubatoren	Innova 4230, New Brunswick Scientific, USA Cytoperm, Heraeus Düsseldorf
Concentrator	Concentrator 5301, Eppendorf
Elektrophoesezellenkammern	
Elektroporator	Gene Pulser II, BioRad
Powerpack	Biometra; BioRad
Photometer	UV-VIS Spectrophotometer, UV-1202 Shimadzu
PCR-Cycler	Mastercycler Personal, Eppendorf Mastercycler Gradient, Eppendorf
Schüttler	Rotationsschüttelmaschine, Pilot-Shake TM, Adolf Kühner AG Basel, Schweiz
Thermomixer	Thermomixer Comfort, Eppendorf
Ultraschallgerät	Sonifier Modell-250D, Branson Instruments Inc., Stanford, Connecticut (USA)
Zentrifugen	Eppendorf 5415D, Tischzentrifuge Sorvall Super T21 Kühlzentrifuge Sigma 4 K15 Kühlzentrifuge Eppendorf 5417R, Kühlzentrifuge
pH-Meter	MP225, Mettler-Toledo AG Schwerzenbach, Schweiz

2.3 Computerprogramme und Datenbanken

Für die Bearbeitung der Ergebnisse wurden folgende Programme eingesetzt.

- 1) Chromas 2.0; Technelysium PTY LTD, Australien
- 2) DNA Tools; Xiongfong Chen, Cornell Univ. Ithaca NY14853
- 3) Primer Express; PE Biosystems
- 4) pDRAW32; Version 1.0, Acaclone Software, Kjeld Olesen
- 5) NCBI Blast; Internet Adresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- 6) PubMed; Internet Adresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 7) Transkription factor Database (TransFac; MathInspector), GBF Braunschweig
Internet Adresse: <http://transfac.gbf.de/TRANSFAC/>
- 8) SPSS 11.0

2.4 Zellkultur

Für die Versuche wurden humane-, Affen-, Drosophila- und Mauszelllinien verwendet. Die U937 (ATCC CRL-1593.2) Zelllinie wurde 1974 von Sundstrom und Nilson aus Lymphgewebe isoliert. Es handelt sich um eine humane myeloische Zelllinie die durch den Überstand einer Lymphozytenkultur, durch Vitamin D₃, Retinoinsäure Phorbolester, Gamma Interferon und TNF (tumo necrosis factor) zur Differenzierung angeregt werden kann. Die Zellen sind negativ für die Produktion von Immunglobulin und negativ in der Expression des Epstein-Barr Virus, exprimieren das Fas-Antigen und sind sensitiv auf TNF und anti-Fas Antikörper (Info Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur).

Verwendet wurden ebenfalls die Zelllinien U937 (B412) und U937 (PR9). Die U937 (B412) Zelllinie ist eine U937 Zelllinie die induzierbar transfiziert ist mit dem Fusionsprotein PLZF/RAR α und U937 (PR9) die ebenfalls induzierbar transfiziert ist mit dem Fusionsprotein PML-RAR α (Puccetti, Sennewald et al. 2001).

Die humane NB4 Zelllinie (DSMZ Nr. ACC207) wurde 1989 aus dem Knochenmark einer 23 Jahre alten Patientin mit einer akuten Promyelozyten Leukämie isoliert (AML FAB M3). Es handelt sich um eine Zelllinie mit der Translokation t(15;17) (q22;q11-12), die das Fusionsprotein PML-RAR α exprimiert (Lanotte, Martin-Thouvenin et al. 1991; Duprez, Ruchaud et al. 1992) (Drexler, Borkhardt et al. 1995).

Weiterhin wurde die humane Hela Zelllinie verwendet, wobei es sich um eine Adenokarzinom-Zelllinie handelt, die 1951 von einer 31 Jahre alten Patientin mit einem Cervix-Carcinom gewonnen wurde. Es ist die erste aneuploide gezüchtete humane Zelllinie (Scherer 1953).

Kasumi 1 (DSMZ Nr. ACC 220) ist eine humane myeloische Zelllinie die 1989 aus dem peripheren Blut eines sieben Jahre alten Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML FAB M2) gewonnen wurde. Die Zellen tragen die Translokation t(8;21) und exprimieren das Fusionsprotein AML1-ETO (Asou, Tashiro et al. 1991).

NIH3T3 ist eine murine Fibroblasten Zelllinie. Diese ist eine embryonale Mauszelllinie, die für Transfektions-Assays benutzt wurde (Jainchill, Aaronson et al. 1969; Copeland and Cooper 1979).

Eine weitere Mauszelllinie, die verwendet wurde, ist die 32D Maus-Zelllinie. Zur Gewinnung dieser Zelllinie wurde murines Knochenmark aus Langzeit-Kulturen von C3H/HeJ Mäusen etabliert, die mit dem Maus Leukämie Virus infiziert sind. Die Zellen sind konstitutiv abhängig von dem Wachstumsfaktor Interleukin 3 (IL3) (Greenberger, Eckner et al. 1983; Greenberger, Sakakeeny et al. 1983; Rovera, Valtieri et al. 1987; Valtieri, Tweardy et al. 1987; Migliaccio, Migliaccio et al. 1989). Zytogenetisch zeigen die 32D-Zellen einen hypodiploiden Karyotyp von 35 (2n) und 5 zentrische Fusionsmarker (DSMZ). Mäuse besitzen normalerweise einen diploiden Chromosomensatz von 38 (2n).

Für die Versuche wurden weiterhin COS7 Zellen verwendet. Bei dieser Zelllinie handelte es sich ursprünglich um Nierenzellen der grünen Meerkatze, die bereits 1981 etabliert wurden. Die ursprüngliche CV-1 Zelllinie ist für die Vermehrung des SV40-Virus permissiv und wurde mit einer SV40-Mutante transfiziert die eine Deletion von 6 bp im Replikationsursprung aufweist und somit nicht mehr replikationsfähig ist (Polack, Delius et al. 1984). Bei der Transfektion mit den Mutanten bildeten sich 3 Zellpopulationen (COS-1, -3 und -7), wovon COS-1 die einzige klonierte Zellpopulation ist und genauer analysiert werden konnte. COS-1 enthält 2 Kopien defekter Genome der SV40-Mutante, welche im Wirtsgenom integriert vorliegen. Eine Kopie enthält die komplette frühe Region und einen Teil der späten (nur VP2), die zweite Kopie enthält nur die späten Gene VP1 und VP2. Alle 3 COS-Zelllinien exprimieren das SV40-T-Antigen und sind permissiv für die Infektion und Vermehrung des SV40-Virus (Gluzman 1981; Mellon, Parker et al. 1981).

Bei den verwendeten S2- (Schneider-2) Zellen handelt es sich um eine Zelllinie der *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege), die 1972 etabliert wurde (DSMZ, ACC 130)(Schneider 1972). Es ist beschrieben, dass diese Zelllinie nur aus XX-Zellen besteht und zu 60–80% tetraploid ist. Diese teiladhärente Zelllinie wächst bei Raumtemperatur in Schneider's *Drosophila* Medium (Gibco) mit 10-15% FBS ohne Zufuhr von CO₂, und lässt sich durch auf und ab pipettieren vom Boden der Kulturflasche lösen. Alle 2-4 Tage wurden die Zellen gesplittet (Verdopplungszeit etwa 40 Stunden). Die S2 Zellen wurden in 70% Medium mit 20% FBS und 10% DMSO in einer Zellzahl von 1-3· 10⁶ Zellen eingefroren. Da diese Zelllinie den Transkriptionsfaktor SP1 nicht exprimiert, eignete sie sich besonders gut um die SP1 Abhängigkeit einer Promotorsequenz zu untersuchen.

Für die einzelnen Versuche wurden normalerweise vorher festgelegte Zellzahlen für die verschiedenen Zelllinien verwendet. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen entweder in einem Zell Counter (Sysmex) oder aber in einer Zählkammer gezählt. Verwendet wurde eine Thoma Zählkammer mit einer Fläche von 0,0025 mm² und einer Tiefe von 0,1 mm. Um während der Zählung lebende Zellen von toten zu unterscheiden wurde 20 µl Zellsuspension mit 20 µl einer Trypanblau Lösung gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während vitale Zellen den Farbstoff ausschließen und im mikroskopischen Bild hell erscheinen, nehmen tote Zellen den Farbstoff auf und sind tiefblau gefärbt. Zur Herstellung der Trypanblau Lösung wurden 0,5% Trypanblau (w/v) und 0,9% NaCl (w/v) in PBS Puffer gelöst. Bei der Zellzählung wurden mindestens vier Großquadrate ausgezählt.

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Zahl der Großquadrate}} \cdot \frac{2 \cdot 10^4}{\text{ml}}$$

2.5 Stammhaltung

Die Stammhaltung von *Escherichia coli* erfolgte in Gefrierkulturen. 1,5 ml Kryoröhrchen wurden mit 300 µl Glycerin beschickt und autoklaviert. Für die Stammhaltung wurden 700 µl der entsprechenden *E. coli* Zellen zugegeben und anschließend bei -80 °C eingefroren.

Die übrigen unter Punkt 2.1 aufgeführten eukaryotischen Zelllinien wurden in einem Stickstofftank bei -196°C eingefroren. Hierzu wurden die Zellen durch einen Zentrifugationsschritt von dem Inkubationsmedium befreit (Kühlzentrifuge, 400g).

Adherente Zellen wurden zunächst trypsiniert und so von der Mediumplatte gelöst. Die Zellen wurden einmal in dem entsprechenden Kulturmedium (15 ml) gewaschen und im Anschluss in Medium mit 20% FCS (Fetales Kälber Serum) aufgenommen. Zu 1,6 ml Zellsuspension wurde tropfenweise 176 µl (10%) DMSO zugegeben und anschließend auf Eis inkubiert. Zum Einfrieren der Zellen wurde eine Kühlbox verwendet in die Isopropanol gefüllt war um zu gewährleisten, dass die Zellen gleichmäßig und nicht zu schnell auf die entsprechende Temperatur abgekühlt werden. Die Zellen wurden so auf -80°C eingefroren (2-3 Tage) und anschließend direkt in den Stickstofftank gegeben. Das Auftauen dieser Zellen wurde bei 37°C durchgeführt. Die Zellen wurden kurz angetaut und direkt in vorgewärmtes 37°C Medium überführt. Die verwendeten eukaryotischen Zelllinien unter Punkt 2.1 wurden alle bei 37°C im Wärmeschrank mit 5% CO_2 angezogen.

2.6 DNA Isolierung

2.6.1 Isolierung chromosomaler DNA

Chromosomale DNA wurde aus den verschiedenen unter Punkt 2.1 beschriebenen Zellen isoliert. Für die Durchführung wurde das DNAzol Reagents der Firma Invitrogen mit dem dazugehörigen entsprechenden Protokoll benutzt. Das bestehende Protokoll der Firma Invitrogen wurde allerdings in einigen Punkten etwas abgeändert mit dem Ziel, die isolierte DNA Menge zu erhöhen.

Um das Restmedium zu entfernen, wurden die Zellen zu Beginn einmal mit PBS gewaschen. Suspensionszellen wurden für diesen Schritt zentrifugiert und in PBS aufgenommen. Anschließend erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (400g) und die Zelllyse in DNAzol. In einem Milliliter DNAzol sollen nach Protokoll maximal 25-50 mg Zellgewebe oder 1×10^7 Zellen aufgenommen werden. Adherente Zellen wurden durch Zugabe von DNAzol und mit Hilfe eines Schabers von den Kulturplatten gelöst. Die Zellen in dem DNAzol wurden dann 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 10000g zentrifugiert.

Von diesem Punkt an wurde das Firmen-Protokoll verändert. Die chromosomale DNA befindet sich nach der Zentrifugation in dem erhaltenen Überstand und kann mit 0,5 ml Ethanol (100%) präzipitiert werden. Besser aber war es, den Überstand abzunehmen und durch die Zugabe von Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)(Sambrook and Gething 1989) aufzureinigen.

Hierzu wurde das gleiche Volumen an Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol zugegeben durch kräftiges Schütteln gemischt und anschließend bei 4°C 15 min und 18000g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde erneut abgenommen und durch die Zugabe des 1,5-fachen Volumen Ethanol (100%) präzipitiert. Das zugegebene Ethanol sollte möglichst Raumtemperatur besitzen und wurde dann zusammen mit der DNA bei 4°C zentrifugiert. Dieser Effekt des herunter Kühlens zeigte bei vielen DNA Fällungen, so auch bei Plasmid DNA, eine höhere Ausbeute. Die DNA wurde bei -20°C gelagert. Die OD (optische Dichte) der DNA wurde im Photometer bei 260 nm bestimmt, und die Konzentration mit der Formel $OD \times 0,05 \times \text{Verdünnungsfaktor}$ errechnet.

PBS-Puffer

NaCl	8 g
KCl	0,2g
KH ₂ PO ₄	0,25g
Na ₂ HPO ₄	1,35g
ddH ₂ O add	1 Liter
pH	7,4

2.6.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Bei der Plasmidisolierung wird die unterschiedliche Konformationen von Plasmid-DNA und chromosomaler DNA ausgenutzt. Während bei der Plasmidisolierung die Plasmid-DNA in überspiralierter Form vorliegt, denaturiert die chromosomale DNA und wird durch alkalische Bedingungen ausgefällt. Die Plasmid-DNA kann so durch Zentrifugation abgetrennt werden. Für die Isolierung von Plasmid-DNA standen unterschiedliche Möglichkeiten zur Verfügung.

Plasmid Mini-Präparationen

Bei der Verwendung des SEQ-Lab Plasmid Mini Kit wurden 5 ml einer Über-Nacht-Kultur des Plasmid enthaltenden E. coli Stammes in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200 µl Puffer RE (mit RNase) resuspendiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl Puffer LY (zur Zelllyse) wurde das Gefäß einmal kurz geschwenkt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Neutralisierung erfolgte durch Zugabe von 150 µl Puffer NE. Der Ansatz wurde kurz geschwenkt und wiederum 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde der Ansatz 30 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 1 ml Ethanol zugegeben und nach kurzem Vermischen wiederum für 20 min unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das entstandene Zellpellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter fünf minütiger Zentrifugation wurde das Pellet im Vakuumkonzentrator getrocknet und in 25 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen.

Für die Plasmid-Minipräparation wurde normalerweise das Aufreinigungs-Kit der Firma Qiagen verwendet. Hierzu wurden 2 ml einer 6 ml E. coli über Nacht Kultur verwendet. Bei diesem käuflich zu erwerbenden Kit handelt es sich ebenfalls um eine alkalische Lyse der E. coli Kultur. Der Vorteil in der Verwendung dieses Kit's liegt in der einfachen, schnellen Handhabung durch der Verwendung von Säulen, an welche die Plasmid-DNA sehr effektiv bindet. Ein Waschschrift und ein Elutionsschrift schließen sich an und die DNA liegt in einer ausreichenden Konzentration und Menge vor.

Ebenfalls wurde ein Plasmid Aufreinigungs-Kit der Firma Eppendorf verwendet. Auch hier wird durch die alkalische Lyse und der Verwendung von Säulen eine gute Ausbeute an Plasmid erzielt.

Plasmid Maxi-Präparationen

Normalerweise wurden für die Transfektionsversuche große Mengen an DNA benötigt. Um diese zu gewinnen, wurde eine Maxi-Präparation der entsprechenden Plasmide durchgeführt. Wie bei der Mini-Präparation wurde bei der Maxi-Präparation ein Kit der Firma Qiagen verwendet. Auch bei diesem Kit wird eine alkalische Lyse der E. coli Zellen durchgeführt, allerdings ist für eine Maxi-Präparation ein größeres Kulturvolumen (200 ml) notwendig. Bei der Verwendung dieses Kit's wurden größere Säulen, an die die DNA bindet, eingesetzt, wodurch auch eine höhere Ausbeute und Reinheit der DNA erwartet werden durfte. Die Ausbeute an Plasmid-DNA variierte und lag zwischen 200 und 1000 ng/µl.

2.7 RNA Isolierung

Die Isolation der RNA mit TRIzol Reagens (Total RNA Isolation Reagent; GIBCO BRL) erfolgte nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll:

Die Zellen wurden vor der RNA-Isolierung ein mal mit PBS Buffer (siehe 2.2) gewaschen. Adherente Zellen wurden mittels TRIzol und durch die Hilfe eines Scrapers von der Platte gelöst. Suspensionszellen wurden zentrifugiert (maximal 2000 rpm) und in PBS-Buffer aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Aufnahme in TRIzol Reagenz.

Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml TRIzol Reagens pro $5-10 \times 10^6$ Zellen aufgenommen und die Zellen lysiert.

Die Zellen wurden fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 0,2 ml Chloroform hinzugefügt. Die Zellen wurden geschüttelt, erneute zwei bis drei Minuten inkubiert und es erfolgte ein Zentrifugationsschritt (12000 x g für 15 Min bei 4°C). Nach der Zentrifugation ließ sich die obere wässrige RNA-Phase abnehmen.

Die RNA wurde durch Mischen mit 0,5 ml Isopropanol präzipitiert. Nach anschließender Inkubation (10 Min, Raumtemperatur) und Zentrifugation (12000 x g für 10 Min bei 4°C) war das RNA Präzipitat als Pellet sichtbar.

Nach Entfernung des Überstandes wurde die RNA in 1 ml 75% Ethanol gewaschen durch etwa ein bis zwei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur (kurz Vortexen) und erneuter Zentrifugation (7500 x g für 5 Min bei 4°C).

Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen und das Pellet kurz luftgetrocknet. Das RNA-Pellet wurde schließlich in RNase-freiem Wasser aufgenommen und durch anschließende Inkubation im Wasserbad (10Min bei 55-60°C) gelöst. Der RNA Gehalt ließ sich photometrisch bei 260nm bestimmen. Die Reinheit der RNA, die mit der Formel A_{260nm}/A_{280nm} berechnet wurde sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Die Konzentration der Probe wurde berechnet nach der Formel: $A_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$.

Die RNA Proben wurden bei -80°C gelagert.

2.8 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird die isolierte RNA in einen komplementären cDNA Strang umgeschrieben. Für diese Methode wurden entsprechende Primer (Random Primer bzw.

Oligo dT Primer) verwendet, die an die spezifische RNA Sequenz binden und somit einen Ausgangspunkt für die fortlaufende Transkription bilden. Die Nukleotide werden durch die Reverse Transkriptase, bei der es sich um eine RNA abhängige DNA-Polymerase handelt, zu einem DNA Strang verknüpft.

Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll von Promega mit der M-MLV(Moloney murine leukaemia virus) reversen Transkriptase.

1 µg RNA wurde mit 1 µl Random Hexamers (3µg/µl), 1 µl RNase out, und DEPC-H₂O (RNase freies Wasser) zu einem Gesamtvolumen von 17,5 µl vermischt und anschließend fünf Minuten bei 70°C (Linearisierung der Enden) inkubiert. Die Proben wurden dann direkt fünf Minuten auf Eis gegeben und anschließend weitere zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 7,25 µl Master-Mix (s.u.) hinzugefügt und eine Stunde im Wasserbad (42°C) sowie zur Denaturierung der Polymerase 15 Min bei 70°C inkubiert. Zuletzt wurden die Proben mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt und konnten bei -20°C gelagert werden.

Master-Mix

Puffer (5x)	5 µl
Reverse Transkriptase (M-MLV)	1 µl
dNTP's	1,25 µl

Aus den so erhaltenen Proben cDNA unterschiedlicher Zelllinien konnten nun durch die PCR Technik unterschiedliche Gene amplifiziert und in entsprechende Expressionsvektoren kloniert werden. Weiterhin konnten in der cDNA durch die Real-Time-RT-PCR (s.u.) die Expression unterschiedlicher Gene gemessen werden.

2.9 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die Technik der Polymerase Kettenreaktion gibt es mittlerweile sehr viele unterschiedliche Protokolle. Alle diese Protokolle basieren auf die Zugabe von PCR Enhancer, unterschiedlicher MgCl Konzentrationen oder auch unterschiedlicher

Hybridisierungstemperatur während der PCR. Alle Veränderungen in diesen Bereichen zeigen einen Einfluss auf die PCR.

Die Firma Biozym hat für diese Technik ein Fail Safe PCR KIT entwickelt das zwölf verschiedene Puffer (A-L) enthält. Die Puffer enthalten alle unterschiedliche MgCl Konzentrationen und Zusätze von PCR Enhancer. In den Puffern sind ebenfalls bereits die dNTP's enthalten. Hier kann nun in eine elf Proben umfassenden PCR ermittelt werden welcher Puffer für die PCR am geeignetsten ist.

Das Protokoll wurde in seiner Zusammensetzung den Anforderungen entsprechend variiert. Bei dem PCR Programm wurde allerdings lediglich die Anzahl der Zyklen oder die Elongationszeit verändert. Für die PCR können unterschiedliche PCR Enhancer eingesetzt werden. Verwendet wurde Dimethylsulfoxit (DMSO, Serva), Glycogen, Formamid (Merck), Q-Solution der Firma Qiagen, 50% Glycerol (Sigma).

<u>Premix</u>		<u>PCR Programm</u>	
Forward Primer (10µM)	1 µl	1) 2 min	96°C
Reverse Primer (10µM)	1 µl	2) 45 sek.	96°C
ddH ₂ O	5,25 µl	3) 45 sek.	64°C
Fail Safe Enzym-Mix	<u>0,25 µl</u>	4) 2-4 min	72°C
Volumen	7,5 µl	5) 7 min	72°C
+ Puffer Mix (A-L)	12,5 µl	Die Schritte 2-4 wurden 30 bis 35 mal wiederholt.	
+ Template DNA	<u>5 µl</u>		
Gesamtvolumen	25 µl		

Ebenso wurden unterschiedliche Polymerasen für die PCR eingesetzt. Die Taq Polymerase (isoliert aus *Thermus aquaticus*, Qiagen) wurde eingesetzt für bestimmte Klonierungsschritte um auszunutzen, dass die Polymerase nach der Elongation am 3'Ende noch ein dA anfügt.

Das Amplifikat mit dem 3'dA Überhang konnte in einen linearisierten Vektor mit einem 5'dT Überhang einkloniert werden. Es wurden allerdings in der Hauptsache Polymerasen verwendet die kein Überhang anfügen. Für die Klonierungen wurden die Primer so konstruiert, dass am 5'Ende der Primer eine Restriktionsschnittstelle eingefügt werden konnte. Den meisten Klonierungen ging eine PCR voraus, bei der entweder die PFU-Polymerase (Stratagene), isoliert aus *Pyrococcus furiosus*, oder die Platinum PFX-Polymerase

(recombinant, Invitrogen), isoliert aus *Pyrococcus. sp* Strain KOD, eingesetzt wurde. Beide Polymerasen besitzen eine proofreading 3'5'Exonuklease Aktivität. Es ist bei der Verwendung der Polymerasen aber immer wieder aufgefallen, dass die PFU-Polymerase weniger Fehler macht, die PFX-Polymerase aber eine höhere Ausbeute einer spezifische Bande produziert.

Die erhaltenen PCR Fragmente wurden entweder über Gelelektrophorese getrennt oder aber für einen anschließenden Restriktionsverdau aufgereinigt.

Zu diesem Zweck wurde der PCR Ansatz auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und die selbe Menge an Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben. Die Lösung wurde in einem Eppendorf Gefäß gründlich geschüttelt und anschließend 10 min bei 18000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 10 µl 3 M NaAc-Lösung (pH 5,2) sowie 220 µl eiskaltes 100% Ethanol zugegeben. Nach kurzem Mischen wurden die Proben für 10 min bei -80°C inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Im letzten Schritt wurde das Pellet kurz getrocknet und in einer entsprechenden Menge H₂O aufgenommen. Im Anschluss an die Restriktion erfolgte die Gelelektrophorese und Trennung der unterschiedlichen Banden.

PCR Ansätze

Template (DNA)	200ng	Template (DNA)	200ng
Primer F+R (10µM)	je 1,5 µl	Primer F+R (10µM)	je 1 µl
dNTP's (10mM)	1,5 µl	dNTP's (10mM)	1,5 µl
MgSO ₄ (50mM)	1 µl	PFU-Buffer	2,5 µl
PFX-Buffer (10x)	5 µl	PFU-Polymerase	1 µl
PFX-Polymerase	1 µl	Glycogen (100mM)	1 µl
PCR-Enhancer Mix	5 µl	ddH ₂ O add	25 µl
ddH ₂ O add	50 µl		

DNA Fragmente aus einer PCR Reaktion oder aber auch Fragmente, die aus einem anderen Vektor mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten wurden, sind verschiedentlich in einer „End Conversion Reaktion“ weiter geschnitten worden. Bei dieser Reaktion handelt es sich um eine S1 Restriktionsendonuklease die nur Einzelstrang DNA schneidet.

So konnte beispielsweise eine beliebige Restriktionsschnittstelle mit einem Überhang „blund end“ geschnitten werden und in eine Stelle eines Vektors gerichtet ligiert werden in die sie sonst aufgrund des Überhangs nicht hinein gepasst hätte.

Restriktionsansatz

DNA Fragment	0,5-2,0 µl
End Conversion Mix	5,0 µl
ddH ₂ O	add 10 µl

2.10 Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Proben, aber auch zur präparativen Isolierung von DNA wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Je nach Größe der zu erwarteten Bandenmuster wurden unterschiedlich konzentrierte Gele eingesetzt. DNA Fragmente wandern in einem elektrischen Feld von der Kathode zur positiv geladenen Anode. Je kürzere die Fragmente sind desto schneller wandern sie, wodurch eine Trennung von größeren Fragmenten stattfindet. Die Agarose (Biozym) wurde in 1xTAE-Puffer gelöst. Für die Gelelektrophorese wurde eine horizontale Elektrophoresekammer der Größe 7 · 8 cm verwendet (Minigel). Nach dem Erstarren wurde die Agarose mit 1xTAE-Puffer überschichtet, die DNA-Proben mit Gelladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der Banden erfolgte bei 50 - 100 Volt. Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgte die Visualisierung der Banden durch eine Ethidiumbromid-Färbung. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff der sich in die Doppelstrang DNA einlagert, und diese so mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Die Banden wurden mit Hilfe einer „Multi Analyst Software“ am Computer ausgewertet.

TE-Puffer (1x)

Tris / HCl	10 mM
EDTA	1 mM
A. demin.	
pH	8,0

TAE-Puffer (50x)

Tris 2 M

Eisessig 0,91 M

EDTA 100 mM

pH 8,3

Gelladepuffer (6x)

Saccharose 40 %

Bromphenolblau 0,25 %

EDTA 20 mM

pH 8,0

2.11 Ligation

Die durch die PCR amplifizierten und im Anschluss restringierten DNA-Fragmente wurden in einem Ligationsansatz in die entsprechenden benötigten Vektoren kloniert. Zu diesem Zweck wurden der Vektor und die zu klonierenden Fragmente einem Restriktionsverdau unterzogen. Die Restriktion wurde im Anschluss durch die Gelelektrophorese überprüft und die entsprechenden Banden aus dem Gel geschnitten. Die Gelstücke wurden aufgereinigt mit Hilfe eines Gelaufreinigungs-Kit's von der Firma MoBio (USA). Das Gel wurde in einem Puffer bei 65°C gelöst und die DNA anschließend durch eine zugegebene Matrix (10 µl) gebunden. Die Matrix wurde kurz herunter zentrifugiert (5 sek.) und es erfolgte ein Waschritt in einem Ethanol enthaltenden Puffer (1 ml). Nach einer abschließenden Zentrifugation von 2 min wurde die DNA wieder durch die Zugabe der doppelten Menge an Wasser (20 µl) von der Matrix gelöst.

Die aufgereinigte DNA wurde wiederum durch eine Gelelektrophorese überprüft, um einerseits die DNA Menge abzuschätzen und andererseits um zu sicher zu stellen das noch genug DNA für die folgende Ligation vorhanden war. Für eine Ligation mit überstehenden Enden („sticky end“-Ligation) wurde für die Ligation ein Verhältnis von Vektor zu Insert in einem molaren Verhältnis von 1:5 gewählt. In einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden Vektor, Insert und H₂O vorgegeben und der Ansatz 5 min bei 70°C inkubiert um ein Aufschmelzen der kohäsiven Enden zu erzielen. Der Ansatz wurde anschließend auf Eis abgekühlt und durch die Zugabe von 1 µl Ligationspuffer sowie 1 µl Enzym komplettiert. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 14,5°C.

2.12 Sequenzierung

Die nichtradioaktive DNA-Sequenzierung basiert auf das Kettenabbruchverfahren von Sanger und Coulson (Sanger, Nicklen et al. 1977). Bei dieser Methode wurde in einer PCR-Reaktion einzelsträngige homologe DNA fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide hybridisiert. Außer den für die Kettenverlängerung benötigten dNTP's enthält das jeweils verwendete Reagens Didesoxinukleotide. Der statistische Einbau der Didesoxinukleotide führt zu einem Kettenabbruch an der entsprechenden Stelle. Die ddNTP's sind so dosiert, dass an jedem zu sequenzierenden Nukleotid ein Kettenabbruch entsteht. Für die Sequenzierung nach dieser Methode sind vier Ansätze notwendig. Jeder dieser Ansätze enthält eines der vier Didesoxinukleotide (ddGTP, ddATP, ddTTP oder ddCTP).

Nach einer neueren Methode werden nicht mehr die Oligo Nukleotide sondern die einzelnen Basen unterschiedlich markiert. Diese Methode hat verschiedene große Vorteile gegenüber der Oligo Markierung. Für die Sequenzierung sind nicht mehr vier Ansätze, die die unterschiedlichen Didesoxinukleotide enthalten, notwendig, sondern aufgrund der unterschiedlichen Markierung kann die Sequenzierung in einem Ansatz durchgeführt werden. Diese Methode bietet den Vorteil innerhalb kurzer Zeit einen hohen Durchsatz an Sequenzierungen zu ermöglichen.

Nach der PCR-Reaktion wurde der Ansatz aufgereinigt um Störende Substanzen wie die Polymerase und den entsprechende PCR-Puffer zu entfernen.

Für die Aufreinigung der einzelnen Proben standen verschiedene Methoden zur Verfügung. Verwendet wurde ein MultiScreen Aufreinigungs-Kit der Firma Millipore. Zu diesem Aufreinigungs-Kit gehörte eine 96-well Platte mit einer Matrix in jedem Slot der Platte. Eine genau vorgegebene Menge SephadexTM G50 wurde in die entsprechenden Slots gegeben und mit 300 µl H₂O gefüllt. Nach einer Inkubationszeit von drei Stunden wurde die Platte in einer Kühlzentrifuge bei 950g 5 min zentrifugiert, erneut mit 100 µl H₂O gefüllt und wiederum abzentrifugiert. Da der Sequenzer auf ein Gesamtvolumen von 20 µl zurückgreift, mussten die PCR Ansätze mit ddH₂O auf dieses Volumen aufgefüllt und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert werden. Das Eluat wurde in einer neuen sterilen Platte aufgefangen und konnte in einem Kapillar-Sequenzer (Applied Biosystems ABI 310) analysiert werden.

PCR-Ansatz

Reaktionsmix BD 3.1	1,0 µl
Plasmid-DNA	200 ng
Primer (1 µM)	1,5 µl
Sequenzier-Buffer (5x)	2,0 µl
ddH ₂ O	add 10 µl

PCR Programm

1) 96°C	4 min
2) 96°C	20 sek
3) 50°C	10 sek
4) 60°C	2 min

Die Schritte 2-4 wurden 30-35 mal wiederholt

2.13 Real-Time RT-PCR (TaqMan)

Die unterschiedliche Expression von Genen und Proteinprodukten ist ein fundamentaler Mechanismus in der Pathologie humaner Erkrankungen. Die unterschiedliche Expression von Genen schließt das veränderte Level normaler Gen Produkte und die modifizierten Proteine, die auf Mutationen in bestimmten Exons herrühren mit ein. Die Technologie der real-time RT-PCR ermöglicht es, die Expression bestimmter Gene auf dem RNA-Level zu einem beliebigen Zeitpunkt zu bestimmen. Diese Technologie kombiniert schnelle Temperatur-Zyklen mit Fluoreszenz Detektion der Produkte und ist deshalb auch unter dem Namen „Rapid Cycle Real-Time RT-PCR“ bekannt. Diese Technologie wird mittlerweile auch eingesetzt, um die Expression der Fusionsproteine in Patientenmaterial nachzuweisen (Grimwade, Langabeer et al. 1998; Grimwade, Walker et al. 1998).

Grundsätzlich stehen für die Fluoreszenzmarkierung unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Eine Methode ist die Verwendung von SybrGreen, einem Farbstoff, der in alle Doppelstrang DNA interkaliert und bei entsprechender Wellenlänge während der PCR detektiert werden kann. Eine etwas sensitivere und spezifischere Methode ist die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Oligos (Probe). Die Enden der Oligonukleotide können mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen wie FAM oder VIC am 5'Ende markiert werden. Am 3'Ende der Oligonukleotide wird ein sogenannter Quencher angefügt (TAMRA). Durch die Polymerase wird der Farbstoff am 5'Ende während der PCR freigesetzt und kann detektiert werden. Um auszuschließen, dass während der PCR chromosomale DNA amplifiziert wurde, wurden die Sequenzen der Oligonukleotide so gewählt, dass diese über eine Exon-Exon Grenze liegen. Für die Durchführung der real-time RT-PCR wurde cDNA verwendet die zuvor aus RNA-Proben mittels reverser Transkription (siehe 2.4) gewonnen

wurde. Für die Herstellung spezifischer Primer wurde das Computerprogramm Primer Express verwendet. Die einzelnen Proben wurden in eine 96-well Platte pipettiert und die Expression spezieller Gene durch PCR in dem „ABI Prism 7700 sequence detector“ gemessen.

<u>Reaktions-Mix</u>		<u>PCR-Programm</u>	
Mastermix	12,5 µl	5 min	50°C
Primer F+R	je 0,125 µl	2 min	95°C
Probe	0,5 µl	2 min	95°C
ddH ₂ O	<u>6,75 µl</u>	2 min	60°C
	20 µl	Die Schritte 2 und 3 wurden 40 mal wiederholt.	

Wenn anstatt der Probe SybrGreen eingesetzt wurde, so musste die entsprechende Menge an Probe durch ddH₂O ersetzt werden. Die cDNA wurde in einem Volumen von 3-5 µl in eine 96-well Platte vorpipettiert und für den Reaktionsmix wurde ein Premix hergestellt der in Aliquots zu 20 µl in die jeweiligen Slots gemischt wurde.

Zur Berechnung der relative Expression der entsprechenden Zielgene wurde die Expression von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) oder TBP (TATA-binding-Protein) als interner Standard gemessen. Der Einsatz des Standards begründet sich darin, dass diese Gene relativ wenig reguliert und in jeder Zellzyklusphase in gleicher Menge exprimiert werden.

2.14 Luziferase Assay

Um Oligonukleotid-Sequenzen auf Promotoraktivität zu untersuchen, wurden Luziferase Assays durchgeführt. Hierzu wurden die Oligonukleotid Sequenzen in einen Vektor kloniert, der eine Luziferase-Gensequenz enthält, jedoch keine entsprechende Promotorsequenz, um die Luziferase zu exprimieren. Die Oligonukleotid Sequenzen wurden vor die Gensequenz der Luziferase in eine MCS Region (multiple cloning site) kloniert. Der entstandene Vektor mit der möglichen Promotorsequenz wurde nach einem in eine unter 2.1 aufgeführte Zelllinie transfiziert und über Nacht inkubiert (37°C, 5% CO₂). Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit PBS Puffer gewaschen. Um die

Luziferaseaktivität zu messen, wurden die Zellen in einem „Passive Lysispuffer“ lysiert und für 30 min auf Eis inkubiert (adhärente Zellen wurden zusätzlich mit einem Schaber von der Kulturplatte gelöst). Nach 30 min konnte die Luziferaseaktivität in einem Luminometer gemessen werden. Hierzu wurden aus dem Luziferase Assay Kit (Promega) 100 µl LAR II (Luziferase Assay Reagent II)- Lösung in einem Luminometer Tube vorgelegt und 20 µl des Zelllysates zugegeben. Die erste Messung in einer Biolumineszenz Reaktion ergab den Wert für die Firefly Luziferase, also die Luziferase vor der die mögliche Promotorsequenz kloniert wurde. Für eine zweite Messung wurde 100 µl einer „Stop and Glo“ Lösung zugegeben und erneut gemessen. Mit dieser Lösung wurde die Lichtreaktion gestoppt und die Aktivität einer zweiten Luziferase gemessen. Der dann ermittelte Wert zeigte die Aktivität einer zweiten Luziferase in einem pRL-Renilla Vektor an, der als Referenz mit transfiziert wurde. In dem Referenz Vektor befand sich vor einer Renilla Luziferase eine bekannte Promotorsequenz mit entsprechender Aktivität. Die Firefly Luziferase (61 kDa) und die Renilla Luziferase (36 kDa) sind Enzyme mit unterschiedlicher Struktur und benötigen für ihre Lumineszenzreaktion daher unterschiedliche Substrate, die in den Lösungen LAR II und „Stop and Glo“ vorhanden sind.

Bei der Berechnung der Aktivität der Oligonukleotid Sequenzen in dem Firefly Vektor wurden die ermittelten Werte auf die Renilla Werte bezogen und die Aktivität eines Leer-Vektors der als Background ebenfalls transfiziert wurde entsprechend abgezogen.

$$(\text{Firefly} - \text{Background}) : (\text{Renilla} - \text{Background}) = \text{Promotoraktivität}$$

2.15 Transformation von Zellen

2.15.1 Transformation von *E. coli*

Für die Klonierungsarbeiten wurde der Stamm *Escherichia coli* DH5α mit den entsprechenden Plasmid-Konstrukten transformiert. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde *E. coli* DH5α in 10 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180-220 rpm inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde ein 50 ml Kolben mit LB-Medium 3 % angeimpft und bis zu einer OD₅₄₆ von 0,6 - 0,7 unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die Zellernte erfolgte anschließend in einer Kühlzentrifuge bei 4 °C und 5000 rpm für 10 min. Das

Zellpellet wurde in 5 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung (100 mM) aufgenommen und für 30 min auf Eis gelagert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1,0 - 1,5 ml eiskalter CaCl_2 -Lösung resuspendiert und auf Eis gelagert.

Transformationskompetente (Ultra-Kompetent) *E. coli* Zellen wurden normalerweise nach der Inoue Methode hergestellt (Inoue, Nojima et al. 1990). Hierzu wurden 250 ml SOB Medium mit einer 25 ml *E. coli* Übernacht Kultur angeimpft und bei etwa 18°C bis zu einer OD_{600} inkubiert. Nachdem die Zellen die optische Dichte erreicht hatten, wurden sie für 10 min auf Eis inkubiert, dann mit 2500g und 4°C 10 min abzentrifugiert, anschließend in 80 ml eiskaltem Transformationspuffer aufgenommen und wiederum für 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (2500g) wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem Transformationspuffer aufgenommen und DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% zugegeben. Nachdem die *E. coli* Zellen erneut 10 min auf Eis inkubiert wurden, konnten sie in 100-150 μl Portionen aliquotiert werden und in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren werden. Die Ultra-Kompetenten *E. coli* Zellen wurden bei -80°C gelagert und konnten etwa 3 Monate benutzt werden.

Zu den kompetenten *E. coli* Zellen wurden die 2-5 μl des Ligationsansatzes zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem Hitzeschock für 0,5-1 min bei 42 °C unterzogen und wiederum für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 500-800 μl LB-Medium (optional 100 μl 20 %iger Glucose-Lösung und 10 μl Thiamin-Lösung (10 mg/ml)) wurden die Zellen für 60-90 min bei 37 °C und 300 rpm auf einem Thermoschüttler (Eppendorf) regeneriert. Die Zellen wurden anschließend in Volumina zu 50 - 200 μl auf AIX-Platten oder LBA-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank „up site down“ inkubiert. Um eine Austrocknung der Zellen zu verhindern wurden die Platten mit Parafilm umwickelt. Bei der Transformation wurde immer eine Negativkontrolle mitgeführt, die eine Aussage darüber machte, ob der jeweils eingesetzte Vektor auch auf beiden Seiten vollständig geschnitten war. In Abhängigkeit von der Anzahl an Klonen auf der Negativ-Kontrollplatte wurde eine entsprechende Anzahl an Klonen auf der Transformationsplatte untersucht.

LB Medium

Pepton, tryptisch verdaut	10 g / l
Hefeextrakt	5 g / l
NaCl	5 g / l
pH	7,5

AIX-Medium

Ampicillin (100 mg / ml)	1 ml / l
IPTG (200 mg / ml)	0,2 ml / l
X-Gal (20 mg / ml)	2 ml / l
Agar	1,5 %
LB-Medium	ad 1000 ml
pH	7,5

Bei der Herstellung von Festmedien wurde 1,5 % Agar zugegeben. Das LB-Medium wurde zusammen mit dem Agar separat autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf etwa 40 °C wurden die nicht autoklavierbaren Medienbestandteile steril zugegeben. Für das X-Gal konnte auch wahlweise Bluo-Gal der Firma Sigma zugegeben werden. Bluo-Gal zeigte sich in der Anfärbung der Kolonien stärker als das X-Gal.

SOB Medium

Bacto Trypton	2%
Hefe Extrakt	0,5%
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
PH	6,7-7,0

Transformationspuffer

Pipes	10 mM
MnCl ₂	55 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM

Vor der Zugabe von MnCl₂ in dem Transformationspuffer musste der pH Wert mit 5 N KOH Lösung auf 6,7 eingestellt werden.

2.15.2 Transfektion eukaryotischer Zellen

Ein grundsätzlicher Unterschied besteht in der Methode der Transfektion von Suspensionszellen oder Adherenten Zellen. Suspensionszellen konnten in der Regel durch Elektroporation transfiziert werden (z.B. U937-, NB4-, 32D-Zellen). Um die Zellen zu elektroporieren wurden die Zellen aus den Kulturflaschen entnommen und bei 400g in einer Kühlzentrifuge 5 min zentrifugiert. Anschließend konnten sie in entsprechendem Volumen Kulturmedium aufgenommen und gezählt werden. Für die Elektroporation wurden zwischen

10^6 und 10^7 Zellen in maximal 300 μl Medium eingesetzt. Der Elektroporator (Gene Pulser II; BioRad) wurden auf 0,975 μF und 280-300 Volt eingestellt, und die für die Transfektion eingesetzte DNA Menge lag zwischen 5 μg und 40 μg . Bei den verschiedenen Ansätzen der Transformation musste darauf geachtet werden, dass etwa gleiche Zeitkonstanten am Gerät eingehalten wurden.

Bei der Transfektion von adhärennten Zelllinien (Hela-, NIH3T3-, COS7-Zellen) konnten je nach Zelllinie unterschiedliche Methode angewandt werden. Für die Transfektion von Hela Zellen wurde das „SuperFect Transfection Reagent“ der Firma Qiagen verwendet. $1-5 \cdot 10^6$ Zellen wurden auf einer 6-well Platte ausgesiedelt und über Nacht, mindestens jedoch acht Stunden anwachsen lassen. Eine Gesamtmenge von 2 μg DNA in entsprechendem Volumen wurde mit Medium ohne Zusätze von Antibiotika und FCS auf 100 μl aufgefüllt. 10 μl SuperFect Reagenz wurden zugegeben, gut gemischt und der Ansatz 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit konnten die Zellen einmal mit PBS Puffer gewaschen werden. Nach Ablauf der Zeit wurde zu dem DNA-SuperFect-Medium Ansatz weitere 600 μl Medium (mit Antibiotika und 10% FCS) gegeben, gut gemischt und zu dem Zellansatz gegeben. Dieser Ansatz musste 2-3 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert werden. Zum Schluss wurden die Zellen einmal mit PBS Puffer gewaschen und über Nacht in den Inkubator (37°C , 5% CO_2) gestellt. Am nächsten Tag konnten die Zellen für weitere Versuche wie Proteinisolierung, RNA-Isolierung oder auch für ein Luziferase-Assay verwendet werden.

Für Zelllinien wie NIH3T3 wurde die Transfektionsmethode mit dem „Lipofectamin PlusTM Reagent“ von der Firma GIBCO BRL (Cat. No.: 10964-013) durchgeführt. Diese Methode ist für diese Zelllinie etwas besser geeignet als die Methode mit dem SuperFect Reagenz.

Eine weitere zu erwähnende Methode ist die Transfektion mit CaPO_4 . Hierzu wurden $1,25-1,75 \cdot 10^6$ Zellen auf einer 6-well Platte ausgesiedelt, und konnten am nächsten Tag transfiziert werden. Zu einer Gesamtmenge von 5 μg DNA in 438 μl H_2O wurde 62 μl CaCl_2 (2M) gegeben und unter zutropfen (Vortexen) lassen 500 μl HBS Lösung (siehe unten). Um das Präzipitat ausfallen zu lassen, wurde die Lösung 10-20 bei Raumtemperatur inkubiert. Die auf der Kulturschale angewachsenen Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und das Präzipitat von insgesamt 1 ml unter Zutropfen zugegeben. Die Zellen wurden nun 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend frisches angewärmtes Medium zugegeben (4 ml für eine 6-well Platte und 10 ml für eine 10 cm Platte). Das Zellen mussten nun mindestens 8 Stunden in dem Medium inkubieren. Nach dieser Zeit wurde das Medium einmal gewechselt und die Zellen für weitere vier Stunden in dem Medium inkubiert. Nach dieser Zeit waren die Zellen

transfiziert und es konnten dann die Anschlussversuche (Luziferase-Assay) durchgeführt werden.

HBS-Lösung (2x)

NaCl	8,0 g
HEPES	6,5 g
Na ₂ HPO ₄ -Lösung	10 ml
H ₂ O	add 500 ml

Na₂HPO₄-Lösung: 5,25 g in 500 ml H₂O

2.16 Proteinisolierung

Um Proteine aus den verschiedenen Zelllinien zu isolieren, wurden die Zellen zunächst in den entsprechenden Kulturmedien angezogen. Eine Zellzahl von etwa 10^7 Zellen (Zählkammer oder Sysmex Microcellcounter) wurde in einer Kühlzentrifuge bei 400g und 4°C zentrifugiert. Anschließend konnten die Zellen in sterilem PBS Puffer aufgenommen resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert werden. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen je nach Zellzahl mit 100 – 500 µl RIPA Puffer (siehe unten) aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 20000g und 4°C zentrifugiert und der Überstand bei –80°C eingefroren.

Eine weitere Möglichkeit war, die Zellen in einem Sonicator aufzuschließen. Dazu wurden die Zellen auf Eis je nach Volumen in einem Eppendorfgefäß oder einem Falkentube (50 ml) für 90 Sekunden 2 Sekunden on / 2 Sekunden off bei einer Amplitude von 40% lysiert. Die Proteinlösung konnte im Anschluss zentrifugiert und bei –80°C eingefroren werden.

RIPA Puffer

NaCl	150 mM
NP-40	1%
DOC	0,5%
SDS	0,1%
Tris (pH 8,0)	50 mM

Der RIPA Puffer konnte bei 4°C gelagert werden. Zur Benutzung musste der Puffer noch mit einem Proteinase Inhibitor komplettiert werden. Eine Tablette des „complete inhibitor“ (Complete EDTA-free Roche 1873580) wurde in 2 ml ddH₂O aufgelöst und im Verhältnis 1:25 dem RIPA Puffer zugegeben.

Bevor die Proteinlysate für weitere Versuche eingesetzt werden konnten, musste die Konzentration an Protein bestimmt werden. Für die Proteinbestimmung standen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung.

Zur Messung der Proteinmenge aus den verschiedenen Zelllinien musste zunächst die Proteinkonzentration im Rohextrakt bestimmt werden. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976).

Bradford-Reagenz:	Coomassie-Brillant-Blue G-250	100 mg
	Ethanol (techn. 96 %)	50 ml
	Phosphorsäure (85 %)	100 ml
	demin.	add 1000 ml

Das Coomassie-Brillant-Blue G-250 wurde in Ethanol gelöst. Anschließend wurde das H₂O und die Phosphorsäure zugegeben. Zur Abtrennung von ungelösten Bestandteilen wurde die Lösung durch einen Faltenfilter oder Whatman Nr.1 filtriert.

Zur Proteinbestimmung wurde der Rohextrakt mit dem Bradford-Reagenz in einem Verhältnis von 1 : 50 gemischt (20 µl Rohextrakt auf 1 ml Bradford-Reagenz).

Der entstehende Protein-Farbstoff-Komplex konnte frühestens nach 5 min, spätestens jedoch nach 60 min bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch bestimmt werden. Die Eichung erfolgte durch den Einsatz von BSA als Standardprotein. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

Eine zweite Möglichkeit ist die Bestimmung der Proteinkonzentration nach dem „BCA Protein Assay Reagent Kit“ von der Firma Pierce (Prod. Nr. 23225). Dieses Kit besteht aus der Lösung A die 50:1 mit der Lösung B vermischt wird. Für das Erstellen einer Standardreihe ist ein Albumin Standard in der Konzentration 2 mg/ml beigelegt. Die photometrische Proteinbestimmung wurde bei 562 nm durchgeführt.

2.16.1 Westernblot Analyse

Die zuvor gewonnen Proteinproben wurden auf Eis aufgetaut, und in entsprechender Menge (10–20 µl) mit dem 6x SDS Sample Buffer 1:6 gemischt. Anschließend wurden die Proben fünf Minuten bei 95°C gekocht und danach direkt auf Eis abgekühlt. Ein Proteingel (ready to use) wurde vorbereitet und in die Gelkammer eingebracht. Die Gelkammer wurde mit einem Running-Buffer gefüllt und nach Entfernen des Gelkammes konnten die Proben in die vorgesehenen Slots pipettiert werden. Für die Proteinbestimmung wurde ein Proteinmarker (Rainbow Marker von BioRad) mitgeführt, der eine Größenbestimmung der Proteinbanden zulässt. Das Proteingel wurde gestartet und zunächst ein Vorlauf von 10 min bei 80-120 Volt durchgeführt. Im Anschluss wurde die Voltzahl auf 120-150 Volt erhöht. Nach etwa einer Stunde war der Lauf beendet und das Gel konnte entweder mit Coomassie-Brillant-Blue gefärbt werden oder direkt für eine Westernblot Analyse mit einer Nitrocellulose-Membran (Hybond ECL; RPN303D) geblottet werden.

Für eine Coomassie-Brillant-Blue Färbung wurde das Gel in einer Färbebox solange gefärbt, bis Banden zu sehen waren. Anschließend wurde das Gel Entfärbt. Bei dieser Methode bindet der Farbstoff an das Protein, so dass bei dem Entfärben des Gels zuerst das Gels entfärbt wird und schließlich die Proteinbanden gut sichtbar sind.

<u>Coomassie-Brillant-Blue</u>		<u>Entfärbe Puffer</u>	
Coomassie-Brillant-Blue R250	0,25 g	Methanol	45%
Eisessig (100%)	10 ml	Eisessig (100%)	10%
ddH ₂ O	45 ml	ddH ₂ O	45%
Methanol	45 ml		

Um die festen Bestandteile zu entfernen, wurde die Coomassie-Brillant-Blue Lösung über Whatman Papier Nr.1 filtriert. Die Lösung konnte mehrfach benutzt werden.

Um das Proteingel zu blotten, wurde eine Nitrocellulose Membran sowie zwei Filterpapiere (9x6 cm) und zwei Schwämme in derselben Größe in einer Wanne mit Transfer-Buffer eingeweicht.

- | | |
|------------------|--------------------------|
| - 1 Schwamm | - Nitrocellulose Membran |
| - 1 Filterpapier | - Filterpapier |
| - Proteingel | - 1 Schwamm |

Bei der Präparation der Blotkassette war es wichtig, darauf zu achten, dass nach jeder Lage die entstandenen Luftblasen entfernt wurden. Die Blotkassette wurde vorsichtig geschlossen und in einer vorgegebenen Richtung in die Blotkammer eingesetzt. Die Blotkammer wurde nun komplett mit Transfer-Buffer gefüllt. Das Blotting konnte über Nacht bei 25 Volt im Kühlraum (4°C) oder bei 60 Volt 3 Stunden durchgeführt werden.

Gel Running Puffer (10x)

Tris Base (MG 121,1)	30,3 g
Glycin (MG 75,07)	144,2 g
SDS	10,0 g
ddH ₂ O	add 1,0 Liter

Transfer Puffer (1x)

Tris Base (MG 121,1)	3,03 g
Glycin (MG 75,07)	14,41 g
Methanol	200 ml
ddH ₂ O	800 ml

Für die Proteindetektion wurde die Kassette vorsichtig geöffnet und die Membran in eine Schale mit PBS-T Puffer gelegt und dreimal kurz mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurde die Membran in Blocking Puffer gegeben und auf dem Shaker eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C geblockt.

Zusammen mit 2 ml des ersten Antikörpers (in Blocking Puffer; z.B. 1:500) wurde die Membran in eine Tüte (etwas größer als die Membran) luftbasenfrei eingeschweißt und eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf dem Shaker inkubiert.

Die Membran wurde nach der Inkubation dreimal kurz mit PBS-T und anschließend dreimal 10 min mit PBS-T auf dem Shaker gewaschen.

Es erfolgte nun die Zugabe von 20 ml der zweiten Antikörperlösung (in Blocking Puffer, z.B. 1:10000) und die Membran wurde eine Stunde bei Raumtemperatur in dieser Lösung inkubiert und anschließend wieder dreimal kurz mit PBS-T Puffer und dann zweimal 10 min mit PBS-T Puffer gewaschen. Im letzten Waschschrift wurde die Membran einmal für 5 min in PBS gewaschen.

Für die Anfärbung wurde die Membran zusammen mit jeweils 500 µl der Lösung A und B des Luminolreagenz in eine Klarsichtfolie eingewickelt und eine Minute im dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Membran auf einem Tuch kurz abgestreift und in eine neue zweite Klarsichtfolie möglichst luftblasenfrei eingeschlagen. In der Dunkelkammer konnte nun die Membran in eine Entwicklungskassette gelegt werden und ein Film auf die Membran positioniert werden. Durch unterschiedliche Entwicklungszeiten konnten die verschiedenen Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Die Membran konnte anschließend mit PBS gewaschen und erneut in eine Tüte (mit PBS) geschweißt im Kühlschrank (4°C) gelagert werden.

Um einen anderen Antikörper zu verwenden, konnte die Membran gestrippt werden, um so den zuvor benutzen Antikörper zu entfernen. Dazu wurde die Membran in ein Falkentube gelegt und der Stripping Buffer zugegeben. Die Membran wurde 30 Minuten bei 65°C im Ofen inkubiert und konnte anschließend wieder geblottet werden.

Eine andere Möglichkeit ist das Entfernen des Antikörpers nach folgendem Protokoll. Fünf Minuten mit ddH₂O und anschließend fünf Minuten in 0,2 M NaOH Lösung waschen. Nach diesem Schritt den Antikörper durch 1-3 maliges Waschen mit ddH₂O auswaschen.

6x SDS Sample Puffer

Tris/HCl (1M)	11,3 ml
Glycerin	13 ml
SDS	3 g
DTT	2,79 g
Bromphenol blau	180 µl
ddH ₂ O	add 30 ml

Stripping Puffer

SDS (10%)	10 ml
Tris (2M; pH 6,7)	3,15 ml
β-Mercaptoethanol	350 µl
ddH ₂ O	45,5 ml

Der 6x SDS Sample Buffer konnte bei -20°C gelagert werden.

Blocking Puffer

Trockenmilch (Skim milk powder)	5 g
PBS-T	100ml

PBS-T

PBS Puffer	500 ml
Tween 20	500 µl

2.17 Kolonie-Assay

Ein Kolonie-Assay wurde durchgeführt um festzustellen, wie sich die Expression einzelner Gene, die in einem Expressionsvektor zusätzlich transfiziert wurden, auf die Proliferation und Koloniebildung der unterschiedlichen Zelllinien auswirkt. Eine Möglichkeit der Beurteilung ist, dass die verwendete Zelllinie das zusätzlich transfizierte Gen bereits selbst besitzt und möglicherweise auch exprimiert, hier liegt dann eine Überexpression des entsprechenden Gens vor, was sich möglicherweise auf die Proliferation auswirkt. Eine andere Möglichkeit ist das die Zelllinie das Gen zwar besitzt, aber nicht exprimiert, da dieses Gen in bestimmten Zelllinien abgeschaltet ist.

Für die Durchführung des Kolonie-Assays wurden Suspensionszellen wie die humane U937-Zelllinie oder aber auch die 32-D Mauszelllinie verwendet. Vor ihrer Verwendung wurden die zu transfizierenden Plasmide einmal präzipitiert. Die Zellen wurden in ihrem entsprechenden Kulturmedium angezogen und nach Erreichen der Zellzahl mit dem Expressionsvektor durch Elektroporation transfiziert. Vor und nach der Elektroporation wurden die Zellen fünf Minuten auf Eis inkubiert.

- 50000 Zellen pro 6 cm Kulturschale
- 300 µl Medium + 1% DMSO
- Elektroporation mit 280 Volt und 0,975 µF
- Transfizierte Zellen in 6 cm Schalen überführen, 1 ml FCS und 1 ml WEHI zugeben
- → über Nacht wachsen lassen

Präparation der Zellsuspension für den Kolonie-Assay:

Die elektroporierten Zellen wurde am nächsten Tag bei 400 g (5 min, 4°C) zentrifugiert und einmal mit 5 ml IMDM Medium gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in der Neubauer Kammer gezählt, und die Zellsuspension wurde auf 500 Zellen pro µl eingestellt.

Präparation des Ansatzes für den Kolonie-Assay:

2 ml angewärmte Methylcellulose mit einer Spritze (10 ml) in ein 50 ml Falcon Tube geben. Zu diesem Ansatz wurden 920 µl FCS (+ 1% Glutamin), 4,6 µl IL-3 (Endkonz.: 1 ng/ml) und 460 µl der Zellsuspension (500 Zellen/µl) zugegeben. Um die Zellen zu selektieren wurden

55,2 µl G418 (Neomycin, Endkonzentration: 0,6 mg/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde nun mit IMDM auf 4,6 ml (1160,2 µl) aufgefüllt.

Nachdem die Zellen zugegeben waren, wurde der Ansatz vorsichtig gemischt um eine Luftblasenbildung zu vermeiden. Wahlweise wurde der Ansatz auch auf dem Vortexer gemischt musste anschließend aber etwa 10 – 20 Minuten bei 37°C inkubiert werden um die entstandenen Luftblasen zu entfernen. Die Zellen konnten nun mit einer Spritze zu 1 ml Portionen in 6 cm Kulturschalen überführt werden.

Nach 10 Tagen (37°C, 5% CO₂) wurden die gebildeten Kolonien ausgezählt werden.

Reagenzien für den Kolonie-Assay:

- Methylcellulose (GIBCO BRL, 2,3% Bestellnummer 10709-012)
- FCS (hitzeinaktiviert)
- IMDM (GIBCO BRL, Bestellnummer 21980-032)
- IL-3 (1 µg/µl)
- Glutamin
- G418 (Neomycin, 50 mg/ml)

Ficollseparation:

Eine Ficollseparation wurde durchgeführt, um eine Zellsuspension aufzureinigen und tote Zellen und Zellreste aus der Lösung zu entfernen. Hierzu wurden 15 ml Lymphoprep (Nycomed) vorgelegt und 35 ml der Zellsuspension vorsichtig auf die Lösung geschichtet. Der Ansatz wurde 20 Minuten bei 400g (4°C) ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde die Interphase entnommen, in ein neues Röhrchen überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in Medium aufgenommen und die Zellen in der Zählkammer ausgezählt.

Präparation der Methylcellulose:

- 100g Methylcellulose (Sigma)
- sterile 1 Liter Flaschen
- 500ml steriles ddH₂O
- Iscove's MDM doppelt konzentriert (GIBCO)

Das doppelt konzentrierte IMDM wurde Vortag zum Auftauen bei 4°C gelagert.

500ml H₂O in einer 1 Liter Flasche zum Kochen bringen. 23g Methylcellulose abwiegen und langsam unter Rühren (Magnetrührer 600 Umdrehungen pro min) in das kochende H₂O geben. Die aufgelöste Methylcellulose zum Kochen bringen und sobald Blasen (Verwirbelungen) zu sehen sind, den Ansatz unter Rühren auf 37°C abkühlen lassen. Wenn der Ansatz abgekühlt ist 500ml Iscove's MDM hinzugeben und gut schütteln. Alle Arbeiten zur Präparation der Methylcellulose müssen unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden.

Der Ansatz wurde in 20ml Aliquots abgefüllt (43% Methylcellulose) und bei -20°C eingefroren.

2.18 Vektoren und Oligonukleotide

Für die Versuche in dieser Arbeit wurden folgende Vektoren und Oligonukleotide verwendet.

Um DNA Sequenzen auf Promotoraktivität zu überprüfen wurden diese in die multiple cloning site des pGL3-Basic Vektors und somit vor die Firefly Luziferase kloniert.

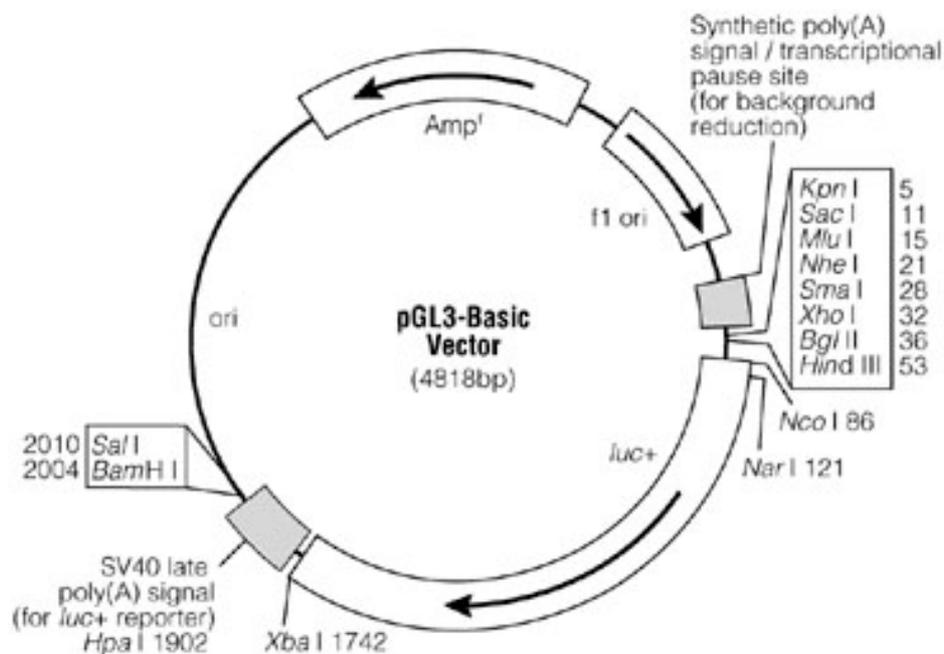


Abbildung 8: pGL3-Basic Vektor und Darstellung der MCS Region der Firma Promega

In den pGL3-Basic Vektor wurden Promotorsequenzen chromosomaler DNA kloniert. Der pGL3-Basic Vektor wurde weiterhin insofern verändert, dass der Thymidin-Kinase Promotor, der nur eine minimale Aktivität aufweist, aus dem pRL-TK Vektor in die Bgl II / Hind III Schnittstelle kloniert wurde.

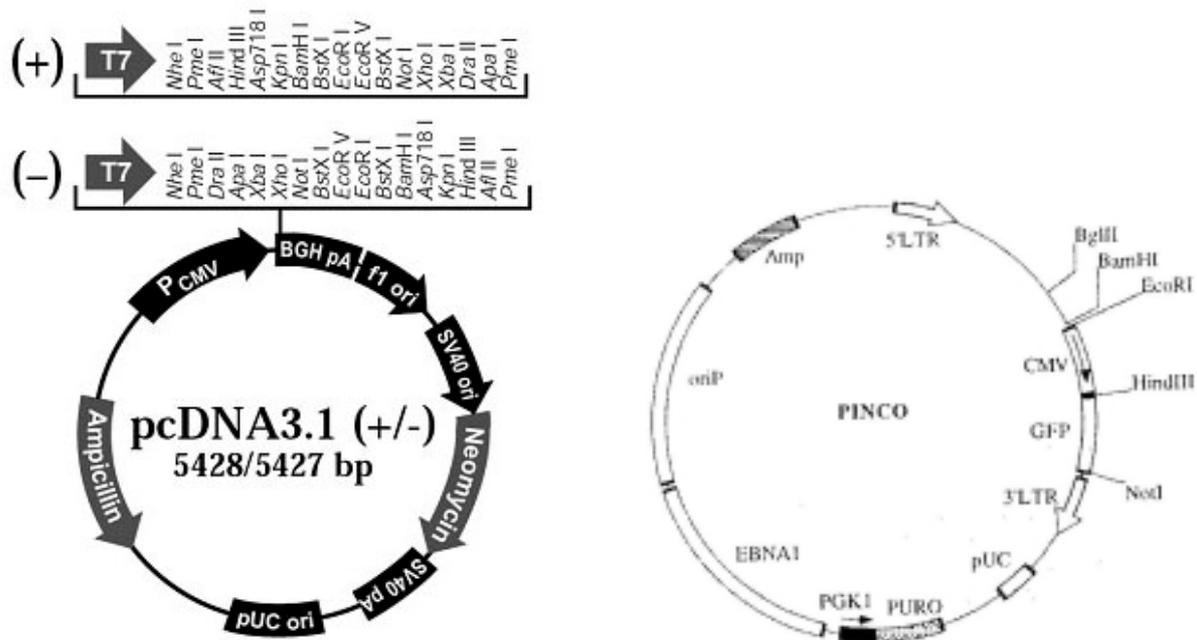


Abbildung 9: Der pcDNA3.1 Expressionsvektor der Firma Invitrogen und der PINCO Vektor (12886 bp) (Grignani, Kinsella et al. 1998).

Für die Amplifizierung wurden die unten stehenden Oligonukleotide verwendet. Um bestimmte Zielgene zu untersuchen, wurden diese aus cDNA amplifiziert und in einen Expressionsvektor kloniert.

Als Klonierungsvektor wurden weitere Vektoren wie der pSTBLUE-1 der Firma Novagen (Schwalbach/Ts.), das TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen (Klonierungen mit einem 3' A Überhang) verwendet. Als Expressionsvektor wurde der PINCO (12886 bp) Vektor eingesetzt der von A. Mencarelli und F. Grignani konstruiert wurde. Bei dem aus dem ursprünglichen LZR-SpBMV-Z Plasmid wurde das LacZ Gen durch das GFP Gen ersetzt und ein CMV Promotor Enhancer aus dem pRc/CMV Vektor in die EcoRI / HindIII Restriktionsschnittstellen eingefügt.

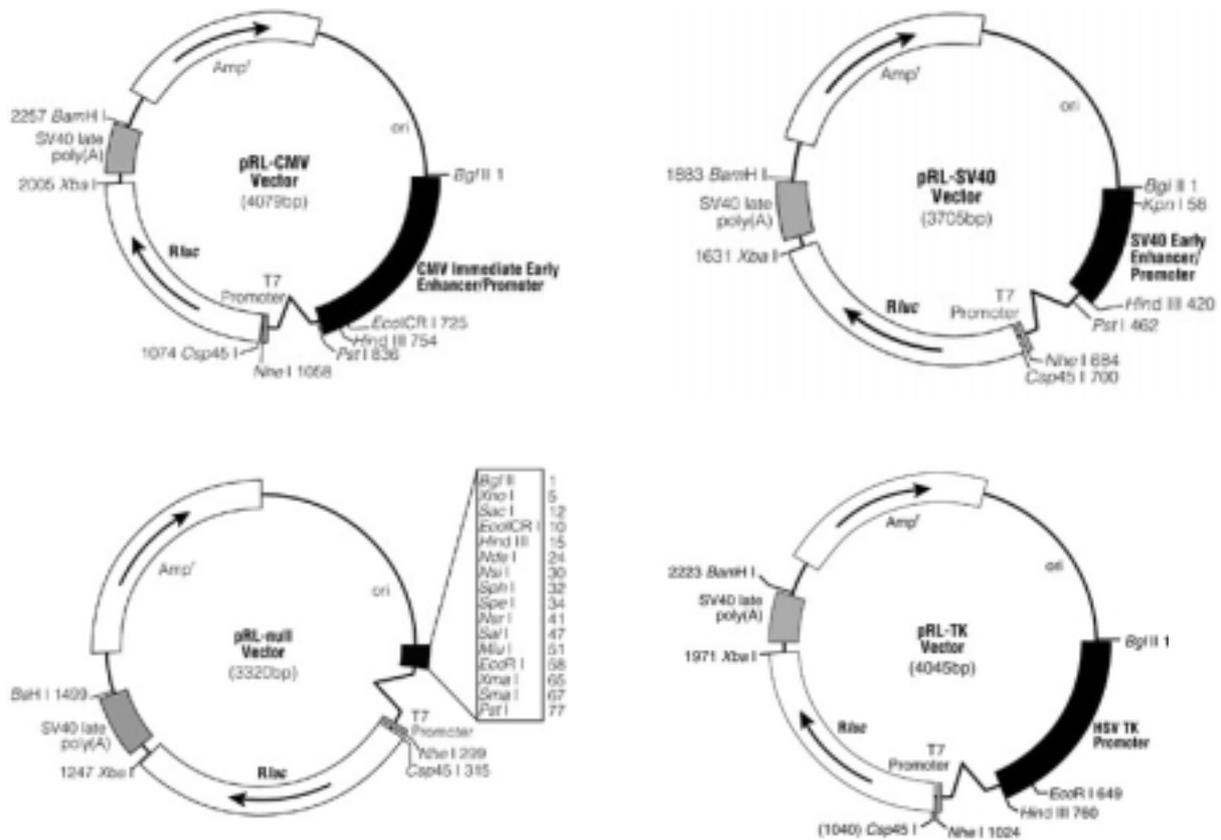


Abbildung 10: Für den Luziferase Assay wurden je nach Zelllinie wie in 2.6.5 besprochen unterschiedliche Renilla Vektoren der Firma Promega als Referenz verwendet, die alle für die Renilla Luziferase kodieren.

Oligonukleotide zur Klonierung in pGL3-Basic-TK

1) Plakoglobin Sense

CAGATCTGGGGCCAATGGCGGGGCCAATGGCGGGGCCAATGGCGGTACCA

2) Plakoglobin Antisense

GATCTGGTACCGCCATTGGCCCCGCCATTGGCCCCGCCATTGGCCCCAGATCT
GGTAC

Die Oligonukleotide wurde mit einem Überhang hergestellt, so das nach dem Restriktionsverdau die Restriktionsschnittstellen 5' Kpn I und 3' Bgl II vorliegen.

Tabelle 4: Sequenzen der Oligonukleotide und die amplifizierten Bereiche

Name	Oligonukleotid Sequenz	Bereich
Plakoglobin F	TCAGGGTACCTGGTTTGGTGGTCCT	-965
Plakoglobin Fx	TCAGGGTACCGGGGCCAATG	-197
Plakoglobin F1	TCAGGGTACCGCAAGCGGATAAACAG	-188
Plakoglobin F2	TCAGGGTACCACGGGACAGTCAGG	-128
Plakoglobin F3	TCAGGGTACCACAGAGGCGGCCGT	-176
Plakoglobin F4	TCAGGGTACCCCGTGGAAGAGGA	-166
Plakoglobin F5	TCAGGGTACCCGAGGCTCCGCC	-146
Plakoglobin R	TCAGAGATCTGGCAGCAACTCAGTAACC	+11
Plakoglobin R1	TCAGAGATCTACCAATGGAAGGGATGG	-640
Plakoglobin R2	TCAGAGATCTAGGGAAGGGACAGACGC	-530
Plakoglobin R3	TCAGAGATCTTTGTGCTGGGGTGGG	-408
Plakoglobin R4	TCAGAGATCTCCTGACTGTCCCGTGG	-188
Plakoglobin mut 1	TCAGGGTACCGGGGCTTATGC	-197
Plakoglobin mut 2	TCAGGGTACCGGGTTTAATGGCAAGC	-197
Plakoglobin mut 3	TCAGGGTACCGGGGCCTTAGGCAAGCGGA	-197
Plakoglobin mut 4	TCAGGGTACCGGGGCCAATAAAAAGCGGATAA	-197
Plakoglobin mut 5	TCAGGGTACCGGGGTTTGCCAATGGCAAGC	-197
Plakoglobin del 6	TCAGGGTACCCCAATGGCAAGCGG	-197
ID2 1301 F (Promotor)	AGGAGGTACCGATTGAGGCAG	-1455
ID2 358 F (Promotor)	CGCGGTACCCCGCACTTAC	-244
ID2 102 R (Promotor)	CGCGAGATCTGCGAGACCGG	+102
ID2 F (Gen)	ATGAAAGCCTTCAGTCCCGTGAGG	
ID2 BamHI F (Gen)	GATCGGATCCATGAAAGCCTTCAGTCCCG	
ID2 R (Gen)	TTATTCAGCCACACAGTGCTTTGCTG	
ID2 Not I R (Gen)	GATCGCGGCCGCTCAGCCACACAGTG	
MEF (Kpn I) F (Gen)	GATCGGTACCGCATGGCTATTACC	
MEF (Bam HI) R (Gen)	GATCGGATCCGCTTATATGTCATGG	

Tabelle 5: Primer und Sonde (T) zur Messung der Gene mittels RT-PCR

ID2 (M97796)-317 forward	GACCACCCTCAACACGGATATC
ID2 (M97796)-391 reverse	TCATTTGACATTA ACTCAGAAGGGAA
ID2 (M97796)-341 T	CATCCTGTCCTTGCAGGCTTCTGAATT
MEF (U32645)-230 forward	TGGAAGGCAGTTTTTTGCTGA
MEF (U32645)-300 reverse	TAAGACTTCCGCGGTTGACAT
MEF (U32645)-252 T	AGATGACAATGAGGCCACCCTCGCACT
PAF (D63391)-44 forward	AGGACGTACAGGGCGACG
PAF (D63391)-111 reverse	CTTATCTTTGCTGTCAGCCACG
PAF (D63391)-66 T	CTGGATGTCCTGCAACATCGGTT
Plakoglobin Gen forward	CCTGTGGACTCTGCGCAA
Plakoglobin Gen reverse	TCAGCACACTCTCCAGGCC
Plakoglobin Gen T	TCTCGGATGTAGCCACCAAGCAGGA

3. Ergebnisse

Um Zielgene der in der Leukämie vorkommenden Fusionsproteine AML1-ETO, PML-RAR α und PLZF-RAR zu identifizieren, wurden die Microarray-Chipanalysen durchgeführt (Firma Affymetrix). Bei dieser Chiptechnik kann zur gleichen Zeit das Expressionsprofil von 6800 Genen gemessen werden. Eingesetzt wurde die RNA aus U937 Zelllinien mit induzierbarer Expression der Fusionsproteine AML1-ETO, PML-RAR α und PLZF-RAR α sowie eine U937 Kontrolle.

Bei der Identifizierung von Zielgenen wurde speziell der Frage nachgegangen, welche Gene durch alle drei Fusionsproteine reguliert werden. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurden Gene identifiziert, die durch ein oder zwei Fusionsproteine aber auch durch alle drei Fusionsproteine reguliert werden, wobei die einzelnen Gene durch die Fusionsproteine reprimiert oder aber in ihrer Expression erhöht werden.

Tabelle 6a: Darstellung regulierter Gene mit und ohne bekannter Funktion

Genbank	Name	Regulation	PML/RAR α	PLZF/RAR α	AML1-ETO
D63391	PAF; Platelet activating factor acetylhydrolase IB gamma	induziert	39,56	31,36	20,04
D31764	KIAA0064 gene	induziert	6,66	6,31	3,91
M57567	ADP-ribosylation factor (hARF5)	induziert	3,06	2,17	2,31
L36983	Dynamin (DNM)	induziert	3,42	2,23	3,08
D16480	mitochondrial enoyl-CoA hydratase	induziert	2,76	3,42	2,54
AB000467	RES4-25	reprimiert	0,00	0,00	0,01
AB000466	RES4-24C	reprimiert	0,01	0,01	0,01
U60206	serine/threonine kinase Krs-1	reprimiert	0,03	0,04	0,04
AB000450	VRK2	reprimiert	0,03	0,04	0,10
U57450	EPC-1 gene	reprimiert	0,06	0,33	0,33
AB000449	VRK1	reprimiert	0,08	0,07	0,11
D49818	Fructose 6-p-,2-kinase/ fructose 2,6-bisphosphatase	reprimiert	0,09	0,21	0,02
U92015	Defective mariner transposon Hsmar2	reprimiert	0,14	0,10	0,14
D31897	Doc2 (Double C2)	reprimiert	0,17	0,07	0,14
U87964	Putative G-protein (GP-1)	reprimiert	0,18	0,18	0,05
AB000115	Human mRNA AB000115	reprimiert	0,18	0,17	0,19
AB000462	SH3 binding protein, clone RES4-23A	reprimiert	0,20	0,11	0,12
K03183	Chorionic gonadotropin beta subunit	reprimiert	0,28	0,05	0,30
AB000409	MNK1	reprimiert	0,29	0,27	0,38
AB002314	KIAA0316	reprimiert	0,37	0,16	0,17
M16750	Pim-1 oncogene	reprimiert	0,44	0,27	0,09

Tabelle 6b: Regulation ausgesuchten Gene durch die Fusionsproteine bekannter Gene

Genbank	Name	Regulation	PML/RAR α	PLZF/RAR α	AML1-ETO
Cadherin-/Catenin- / wnt-Signalweg					
Z68228	Plakoglobin (γ -catenin)	induziert	4,20	5,08	4,62
L76702	Protein Phosphatase 2 A B56-delta	induziert	5,54	3,39	4,16
AB000895	Cadherin FIB1	reprimiert	0,14	0,06	0,36
AB000896	Cadherin FIB2	reprimiert	0,26	0,07	0,31
Zelloberflächen- / sekretierte Proteine / extrazelluläre Matrix					
M16279	MIC2 mRNA	induziert	3,72	2,42	2,92
D83782	KIAA0199 Gene	induziert	5,59	3,36	4,30
AF008445	Phospholipid scramblase	reprimiert	0,03	0,03	0,07
S76942	Dopamine D4 receptor	reprimiert	0,04	0,47	0,12
Y00787	Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor	reprimiert	0,11	0,11	0,22
AB000220	Semaphorin E	reprimiert	0,13	0,08	0,16
M92302	Calcium Channel, Voltage-Gated, Beta 1 Subunit	reprimiert	0,16	0,10	0,04
AB000114	Osteomodulin	reprimiert	0,17	0,02	0,09
L14561	Atpase, Ca ²⁺ Transporting, Plasma Membrane 1	reprimiert	0,21	0,23	0,19
D79206	Ryudocan core protein	reprimiert	0,22	0,06	0,13
M32578	MHC class II HLA-DR beta-1 mRNA (DR2.3)	reprimiert	0,26	0,17	0,06
AF014958	Chemokine receptor X (CKRX)	reprimiert	0,28	0,07	0,16
AF000562	Uroplakin II	reprimiert	0,45	0,23	0,32
Myeloische Differenzierung					
U32645	Myeloid elf-1 like factor (MEF)	reprimiert	0,22	0,07	0,07
M13207	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor 1	reprimiert	0,29	0,25	0,06
M97796	Helix-loop-helix protein (ID2)	reprimiert	0,30	0,42	0,17
M26683	Monocyte Chemotactic Protein 1	reprimiert	0,36	0,42	0,23
Transkription / Chromatin / nukleäre Proteine					
X73358	hAES-1 mRNA	induziert	61,77	54,95	54,95
Z36714	Cyclin F	induziert	30,13	20,07	14,67
M31523	Transcription Factor Itf-1	induziert	5,77	4,16	4,22
U65093	msg1-related gene 1 (mrg1)	induziert	2,10	2,63	3,26
X70683	SOX-4 protein	induziert	2,09	2,01	2,48
U61145	Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)	reprimiert	0,24	0,32	0,18
AB000905	H4 histone	reprimiert	0,30	0,29	0,28
D87673	Heat shock transcription factor 4	reprimiert	0,33	0,04	0,05
X79200	SYT-SSX, synovial sarcoma translocation junction	reprimiert	0,34	0,43	0,24
Z49825	Hepatocyte nuclear factor 4 alpha	reprimiert	0,34	0,31	0,29

Nach einer statistischen Analyse der Ergebnisse (Dr. C. Müller-Tidow), wurden Gene die als Transkriptionsfaktoren bekannt waren oder aber in der myeloischen Differenzierung wichtig sind, identifiziert und die Regulation dieser Gene durch Real-Time RT-PCR verifiziert. Die Überprüfung von 60 Genen durch die Real-Time RT-PCR wurde mit SybrGreen durchgeführt und zeigte im Vergleich zu den Ergebnissen der Chip Analyse zum Teil unterschiedliche Ergebnisse. Von dieser Überprüfung sind 52 Gene in der Tabelle 6 a und b aufgeführt.

Lediglich 14 der oben aufgeführten Gene wurden durch alle drei Fusionsproteine induziert und 38 Gene reprimiert. Aus diesen 52 Genen wurden nun vier Gene ausgesucht, die genauer analysiert werden sollten. Hierfür wurden spezifische PCR Sonden (Probe), die in einer weiteren Überprüfung durch Real-Time PCR eingesetzt wurden. Bei der Herstellung der Primer wurde darauf geachtet diese über eine Exon-Exon Grenze zu legen, um eine Amplifizierung von eventuell vorhandener chromosomaler DNA auszuschließen. Bei diesen Genen handelt es sich um γ -Catenin (Plakoglobin; Z68228), ID2 (Inhibitor of differentiation 2; M97796), PAF (platelet activating factor acetylhydrolase IB gamma-subunit; D63391), MEF (myeloid elf-1 like factor; U32645). Die Messungen erfolgte in cDNA aus der U937 Zelllinie. Den Zellen wurde Vitamin D3 (D3), Trichostatin A (TSA) oder beides zugegeben. Ebenfalls wurde eine Kontrolle mitgeführt, der weder Vitamin D3 noch Trichostatin A zugegeben wurde. Aus den Zellen wurde anschließend die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die erneute Überprüfung der Gene zeigte folgendes Ergebnis.

Tabelle 7: Regulation der ausgesuchten Gene durch die Fusionsproteine in der induzierbaren U937 Zelllinie mit und ohne Zugabe von Vitamin D3 (D3) und Trichostatin A (TSA).

	Plakoglobin	MEF	ID2	PAF
U937	1	1	1	1
U937+D3	1,14	4,04	0,89	0,27
U937+D3+TSA	3,74	0,39	0,50	1,49
PML-RAR α	2,38	0,56	0,25	1,41
PML-RAR α +D3	2,95	2,51	0,37	1,35
PML-RAR α +D3+TSA	5,86	0,28	0,38	0,38
PLZF-RAR α	2,05	0,17	0,29	0,60
PLZF-RAR α +D3	2,69	0,47	0,46	0,65
PLZF-RAR α +D3+TSA	4,17	0,04	0,33	0,69
AML1-ETO	5,66	0,38	0,15	0,44
AML1-ETO+D3	4,75	0,97	0,17	0,96
AML1-ETO+D3+TSA	5,92	0,18	0,28	1,12

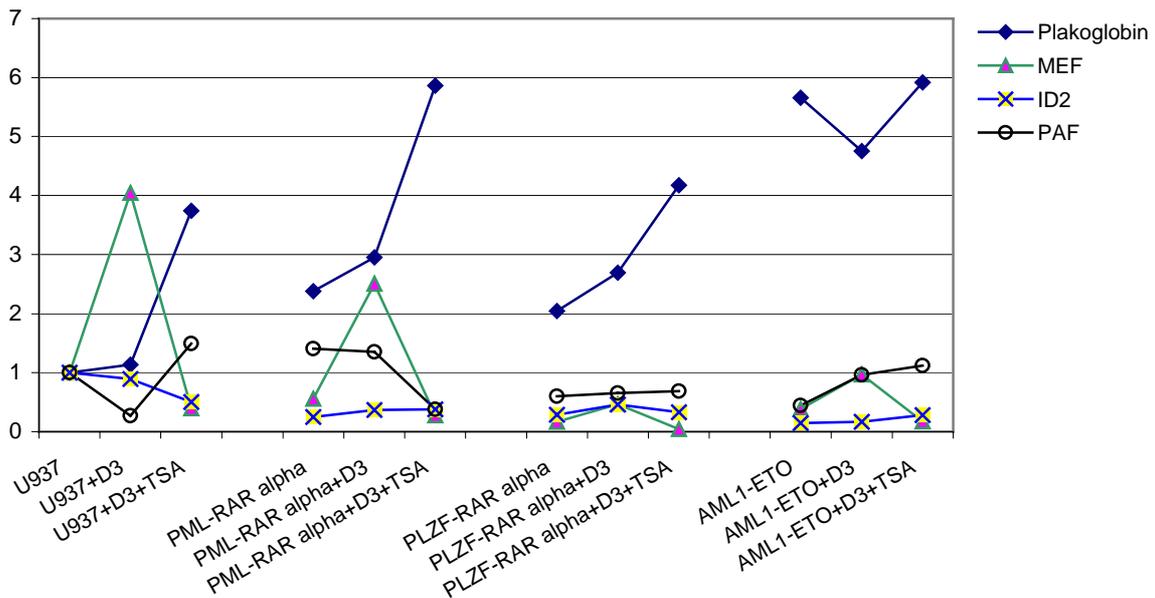


Abbildung 11: Regulation der angegebenen Gene durch die Fusionsproteine sowie durch Zugabe von Trichostatin A (TSA) und/oder Vitamin D3 (D3).

Die Ergebnisse der Real-Time RT-PCR wurden auf die Daten der U937 Zelllinie ohne Vitamin D3 und Trichostatin A (TSA) normiert. Trichostatin A ist ein Inhibitor der Histone Deacetylasen (Vigushin, Ali et al. 2001), so dass durch die Zugabe eine entsprechend höhere Expression der entsprechenden Gene erwartet wurde. Untersuchungen mit der spezifischen Sonde in der Real-Time RT-PCR für das PAF-Gen zeigten eine eher schwache Regulation durch die Fusionsproteine. In weiteren Schritten wurde deshalb nur mit Plakoglobin, ID2 sowie von MEF weitere Untersuchungen durchgeführt.

Die Expression der ausgesuchten Gene wurden weiterhin in Knochenmark Proben von AML Patienten untersucht. In sechs Patientenproben war das Fusionsprotein AML1-ETO und in drei das Fusionsprotein PML-RAR α nachgewiesen worden. Die restlichen 57 Patienten hatten keine chromosomale Anomalie bei der eines der speziell interessierenden Fusionsproteine nachgewiesen werden konnte. Für die Untersuchung wurde die RNA aus 66 Patientenproben isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend eine Real-Time RT-PCR durchgeführt.

Tabelle 8: Daten der Real Time RT-PCR (Mittelwerte) aus Patientenproben ohne Expression eines der aufgeführten Fusionsproteine.

	GAPDH	ID2	MEF	Plakoglobin		GAPDH	ID2	MEF	Plakoglobin
1	17,72	2,10	2,62	100,85	30	15,04	2,61	4,61	140,32
2	33,09	0,91	1,72	59,57	31	36,21	1,95	1,25	32,11
3	1,51	10,26	10,29	152,95	32	25,87	9,26	1,77	15,85
4	66,87	11,58	0,83	6,49	33	12,50	1,73	5,47	109,19
5	0,14	1,74	94,41	2253,37	34	23,40	0,78	3,31	167,18
6	22,72	1,59	6,91	9,09	35	4,98	14,45	5,08	133,98
7	9,79	10,50	2,43	27,24	36	3,22	2,55	2,51	529,86
8	10,89	2,91	3,11	91,51	37	7,39	6,74	2,57	23,73
9	17,74	0,56	1,64	44,00	38	17,60	2,92	2,75	196,15
10	2,50	4,40	2,73	151,87	39	24,47	2,52	2,55	2,85
11	20,46	4,14	2,07	10,14	40	0,01	83,00	17,00	0,00
12	16,04	2,32	2,56	537,10	41	26,50	4,96	1,68	5,71
13	3,50	4,19	5,02	33,21	42	23,84	2,89	4,22	35,19
14	24,54	1,04	1,34	204,56	43	46,75	1,16	1,55	43,01
15	32,22	1,14	3,70	169,36	44	25,83	2,36	2,27	292,99
16	8,99	11,15	5,14	423,19	45	21,65	7,39	2,53	9,46
17	9,09	2,25	2,61	78,78	46	12,19	3,70	2,00	153,43
18	10,74	10,01	1,74	17,41	47	6,18	1,64	11,13	185,06
19	10,78	3,73	8,44	3,53	48	19,07	6,14	5,76	573,75
20	19,97	1,49	7,59	202,04	49	14,73	6,53	2,67	46,87
21	25,52	4,10	4,32	3,98	50	25,57	0,69	2,25	194,90
22	55,08	2,61	1,65	59,77	51	0,49	18,81	19,57	391,79
23	7,60	2,60	1,85	92,18	52	298,22	0,33	1,12	180,73
24	21,94	16,47	4,45	10,17	53	2,25	4,29	8,19	665,98
25	32,96	1,70	4,79	80,67	54	1,72	6,20	2,10	128,35
26	57,17	0,28	1,95	53,58	55	5,01	0,89	3,66	42,50
27	48,23	0,83	2,00	95,45	56	13,78	0,83	2,72	60,78
28	35,05	0,39	0,99	133,49	57	169,48	0,61	2,59	8,10
29	56,86	0,90	1,97	152,81					

Tabelle 9: Daten der Real Time RT-PCR (Mittelwerte) aus Patientenproben mit Expression eines der aufgeführten Fusionsproteine.

	GAPDH	ID2	MEF	Plakoglobin	Fusionsprotein
1	139,54	0,13	0,67	68,02	AML1-ETO
2	350,60	0,16	1,71	153,23	AML1-ETO
3	12,04	1,33	0,80	359,15	AML1-ETO
4	17,57	0,51	0,81	69,49	PML-RAR α
5	22,52	1,15	1,10	505,24	AML1-ETO
6	16,21	1,53	2,06	451,39	AML1-ETO
7	33,78	1,23	1,07	116,10	PML-RAR α
8	9,08	0,55	3,69	695,31	AML1-ETO
9	0,78	3,17	2,10	124,43	AML1-ETO

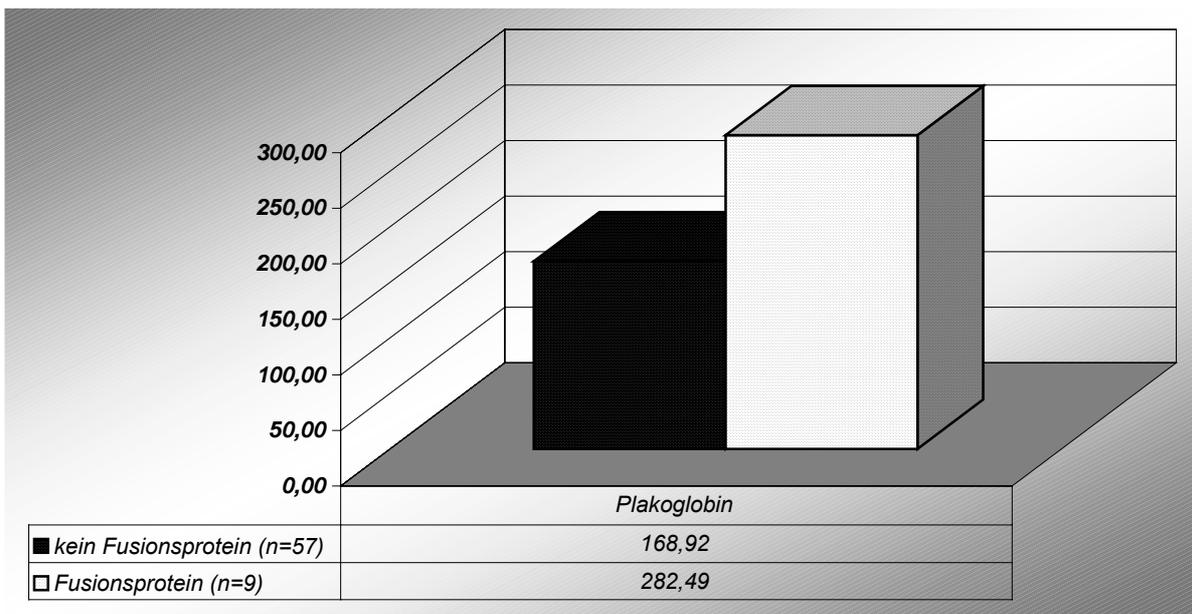
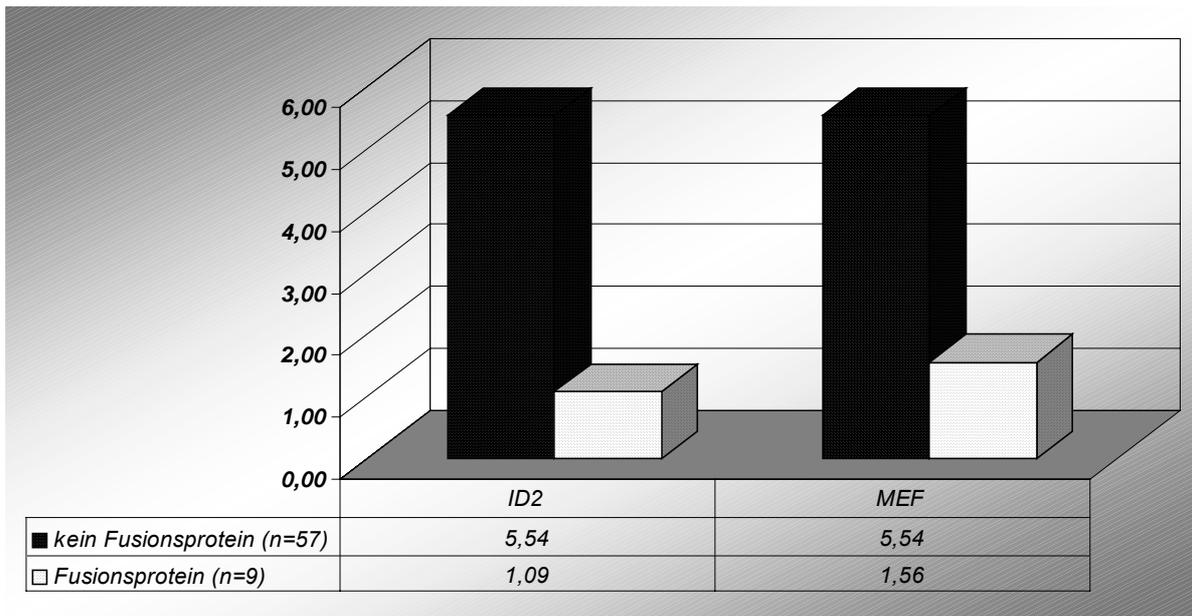


Abbildung 12: Expressionsanalyse der durch die Fusionsproteine regulierten Gene in Patientenproben mit und ohne Expression eines der Fusionsproteine.

3.1 Untersuchung des MEF Gens

3.1.1 Klonierung des MEF Gens

Das MEF Gen wurde mit Hilfe der PCR-Methode aus der cDNA von U937 Zellen amplifiziert und in den pCDNA3.1 kloniert. Das MEF Gen hat eine Größe von 1992 bp und das Protein besteht aus 663 Aminosäuren mit einem PI von 5.42 (ExpASy Molecular Biology Server). Das MEF Gen wurde kloniert, um unter anderem einen Kolonie-Assay durchzuführen und so den Einfluss des Gens auf die Proliferation zu beurteilen. Die verwendeten Primersequenzen zur Amplifizierung des MEF Gens aus cDNA sind in Fett dargestellt; das Start ATG sowie Stop TAA in rot.

```

GAATTCCCTT TCGCCGGCGC CGAGTTCCTG GCGCCGCTCG CCCGGCCCCGG 50
CTTCCGAGGG GAGAGGACGG GCTGGCGGGG CTGGGGACCC GCGTCTCGGC 100
CCCCGGAGCG GGGACCACGG AGACAGACCC CGGCCCGGCG ACCGAGCTGG 150
GCCCCGTGAGC CACTCGGCCT CAGGTCGCTC CTGTGGTTGG TCCAGCCCAG 200
AATGCAGCCT TGAGCCTGGC TTAGGCCACC ACCTACTCCA GCTCTCTCCA 250
CCCCCTATTT TACTGCAGCT CAGGGGGTAG GCTCTAGGCT CCAAAGTACC 300
TGGGTATTGT CCCTTCATCA AGAAAGCCCC ACAGCTCTGG AGGGCTCTGA 350
TAATCCCGTT GTCAGCTCTC TGAAAAGACA GCATGGCTAT TACCCTACAG 400
CCCAGTGACC TGATCTTTGA GTTCGCAAGC AACGGGATGG ATGATGATAT 450
CCACCAGCTG GAAGACCCCT CTGTGTTCCC AGCTGTGATC GTGGAGCAGG 500
TACCCTACCC TGATTTACTG CATCTGTACT CGGGACTGGA GTTGGACGAC 550
GTTCAACAATG GCATCATAAC AGACGGGACC TTGTGCATGA CCCAGGATCA 600
GATCCTGGAA GGCAGTTTTT TGCTGACAGA TGACAATGAG GCCACCTCGC 650
ACACCATGTC AACCGCGGAA GTCTTACTCA ATATGGAGTC TCCAGCGAT 700
ATCCTGGATG AGAAGCAGAT C TTCAGTACC TCCGAAATGC TTCCAGACTC 750
GGACCCTGCA CCAGCTGTCA CTCTGCCCAA CTACCTGTTT CCTGCCTCTG 800
AGCCCGATGC CCTGAACAGG GCGGGTGACA CTAGTGACCA GGAGGGGCAT 850
TCTCTGGAGG AGAAGGCCTC CAGAGAGGAA AGTGCCAAGA AGACTGGGAA 900
ATCAAAGAAG AGAATCCGGA AGACCAAGGG CAACCGAAGT ACCTCACCTG 950
TCACTGACCC CAGCATCCCC ATTAGGAAGA AATCAAAGGA TGGCAAAGGC 1000
AGCACCATCT ATCTGTGGGA GTTCCTCCTG GCTCTTCTGC AAGACAGAAA 1050
CACCTGTCCC AAGTACATCA AGTGGACCCA GCGAGAGAAA GGCATCTTCA 1100
AACTGGTGGA CTCCAAAGCT GTGTCCAAGC TGTGGGGGAA GCAGAAAAC 1150
AAGCCTGACA TGAACTATGA GACAATGGGG CGGGCACTAA GATACTACTA 1200
CCAAAGAGGC ATACTGGCCA AAGTGGAAGG GCAGAGGCTG GTGTACCAGT 1250
TTAAGGAGAT GCCCAAGGAC CTGGTGGTCA TTGAAGATGA GGATGAGAGC 1300
AGCGAAGCCA CAGCAGCCCC ACCTCAGGCC TCCACGGCCT CTGTGGCCTC 1350

```

TGCCAGTACC ACCCGGCGAA CCAGCTCCAG GGTCTCATCC AGATCTGCCC 1400
 CCCAGGGCAA GGGCAGCTCT TCTTGGGAGA AGCCAAAAAT TCAGCATGTC 1450
 GGTCTCCAGC CATCTGCGAG TCTGGAATTG GGACCGTCGC TAGACGAGGA 1500
 GATCCCCACT ACCTCCACCA TGCTCGTCTC TCCAGCAGAG GGCCAGGTCA 1550
 AGCTCACCAA AGCTGTGAGT GCATCTTCAG TGCCCAGCAA CATCCACCTA 1600
 GGAGTGGCCC CCGTGGGGTC GGGCTCGGCC CTGACCCTGC AGACGATCCC 1650
 ACTGACCACG GTGCTGACCA ATGGGCCTCC TGCCAGTACT ACTGCTCCCA 1700
 CTCAGCTCGT TCTCCAGAGT GTTCCAGCGG CCTCTACTTT CAAGGACACC 1750
 TTCACTTTGC AGGCCTCTTT CCCCTGAAC GCCAGTTTCC AAGACAGCCA 1800
 GGTGGCAGCC CCAGGGGCTC CACTGATTCT CAGTGGCCTC CCCCAACTTC 1850
 TGGCTGGGGC CAACCGTCCG ACCAACCCGG CGCCACCCAC GGTACACAGGG 1900
 GCTGGACCAG CAGGGCCCAG CTCTCAGCCC CCTGGGACTG TCATTGCTGC 1950
 CTTCATCAGG ACTTCTGGCA CTACAGCAGC CCCTAGGGTC AAGGAGGGGC 2000
 CACTGAGGTC CTCCTCCTAT GTTCAGGGTA TGGTGACGGG GGCCCCCATG 2050
 GAGGGGCTGC TGTTTCCTGA AGAGACCCTG AGGGAGCTCC TGAGAGATCA 2100
 GGCTCATCTT CAGCCACTTC CAACCCAGGT GGTTTCCAGG GGTTCACACA 2150
 ATCCGAGCCT TCTGGGCAAC CAGACTTTGT CTCCTCCAG CCGCCCCACT 2200
 GTTGGGCTGA CCCCAGTGGC TGAACTTGAG CTCTCCTCAG GCTCAGGGTC 2250
 CCTGCTGATG GCTGAGCCTA GTGTGACCAC ATCTGGGAGC CTTCTGACAA 2300
 GATCCCCCAC CCCAGCCCCT TTCTCCCAT TCAACCCTAC TTCCCTCATT 2350
 AAGATGGAGC **CCCATGACAT ATAAGCAAAG** GGGTCAGGGC AAGTGTGACC 2400
 CACCAGGCAA AATTGAGCAG CATTTTCATA GGGACCGACT TCAGTAGCAC 2450
 ACCTGCCCT GCATTTTCAGT GGGATGTCAA TACTTGGAC CCCAAGTCCC 2500

Aminosäuresequenz des MEF Gens:

MAITLQPSDL IFEFASNGMD DDIHQLEDPS VFPAVIVEQV PYPDLLHLYS GLELDDVHNG 60
 IITDGTLCMT QDQILEGSFL LTDDNEATSH TMSTAEVLLN MESPSDILDE KQIFSTSEML 120
 PDSDPAPAVT LPNYLFPASE PDALNRAGDT SDQEGHSLEE KASREESAKK TGKSKKRIRK 180
 TKGNRSTSPV TDPSIPIRKK SKDGKGSTIY LWEFLLALLQ DRNTCPKYIK WTQREKGIFK 240
 LVDSKAVSKL WGKQKNKPDN NYETMGRALR YYYQRGILAK VEGQRLVYQF KEMPKDLVVI 300
 EDEDESSEAT AAPPQASTAS VASASTTRRT SSRVSSRSAP QGKGSSSWEK PKIQHVGLQP 360
 SASLELGPSL DEEIPTTSTM LVSPAEGQVK LTKAVSASSV PSNIHLGVAP VSGSALTLQ 420
 TIPLTTVLTN GPPASTTAPT QLVLQSVPAE STFKDTFTLQ ASFPLNASFQ DSQVAAPGAP 480
 LILSGLPQLL AGANRPTNPA PPTVTGAGPA GPSSQPPGTV IAAFIRTS GT TAAPRVKEGP 540
 LRSSSYVQGM VTGAPMEGLL VPEETLRELL RDQAHLQPLP TQVVSARGSHN PSLLGNQTLN 600
 PPSRPTVGLT PVAELELSSG SGSLLEMAEPS VTTSGLLTR SPTPAPFSPF NPTSLIKMEP 660
 HDI 730

3.1.2 Kolonie-Assay des MEF Gens

Zur Analyse des MEF Gens wurde ein Kolonie Assay durchgeführt. 32D Zellen wurden mit einer Gesamtmenge an DNA von 20 µg transfiziert und der Kolonie Assay wie bei dem ID2 Gen (siehe weiter unten) durchgeführt. Die Selektion erfolgte durch Zugabe von Neomycin (G418).

Tabelle 10: Ausgezählte Kolonien der mit dem MEF Gen transfizierten 32D Zellen

	A	B	C	Mittelwert	Standardabweichung
pCDNA3.1	158	114	135	136	22
MEF	143	127	154	141	13
MEF + AML1-ETO	197	163	182	181	17

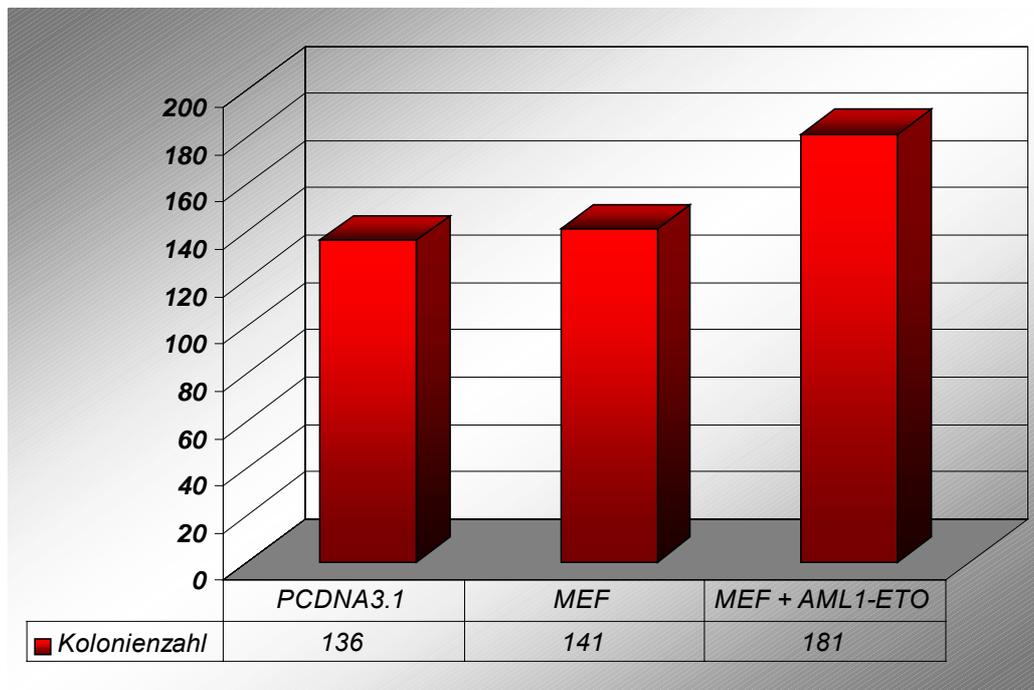


Abbildung 13: Prozentualer Anteil der aus 32D Zellen gebildeten Kolonien für das MEF Gen

Das MEF Gen zeigt hier im Vergleich zur Kolonienzahl der mit pCDNA3.1 transfizierten 32D Zellen keinen Unterschied in der Kolonienzahl. Die zusätzliche Expression des MEF Gens zeigt somit auf die Kolonienbildung keinen Einfluss.

3.2 Untersuchung des ID2 Promotors

Der Promotor wurde aus chromosomaler DNA, die aus der U937 Zelllinie isoliert wurde amplifiziert und hatte eine Größe von insgesamt 345 bp.

```

CCGCCCCCGG CCAGCCCCGC ACTTACTGTA CTGTACTCTA TTTACCACCC 50
CAGCTGGGCT CGCGCCCCGC CCACCCCGCG GGGATTGGCT GCGAACGCGG 100
AAGAACCAAG CCCACGCCCC GCGCCCGCGC CACCAATGG AAGCGCCCGC 150
TCGTCTTGAT AGACGTGCCA CCTTCCGCCA ATGGGGACGA AGGGAAGCTC 200
CAGCGTGTGG CCCC GGCGAG TGC GGATAAA AGCCGCCCCG CCGGGCTCGG 250
GCTTCATTCT GAGCCGAGCC CGGTGCCAAG CGCAGCTAGC TCAGCAGGCG 300
GCAGCGGCGG CCTGAGCTTC AGGGCAGCCA GCTCCTCCG GTCTCGCCTT 350
CCTCGCG

```

Der Transkriptionsstartpunkt (Biggs, Zhang et al. 1995) sowie die Oligonukleotide zur Amplifizierung des ID2 Promotors sind hervorgehoben. Kloniert wurde der Promotor in den pGL3-Basic Luziferase Vektor so das dessen Aktivität in verschiedenen Zelllinien mittels Luziferase Assay analysiert werden konnte.

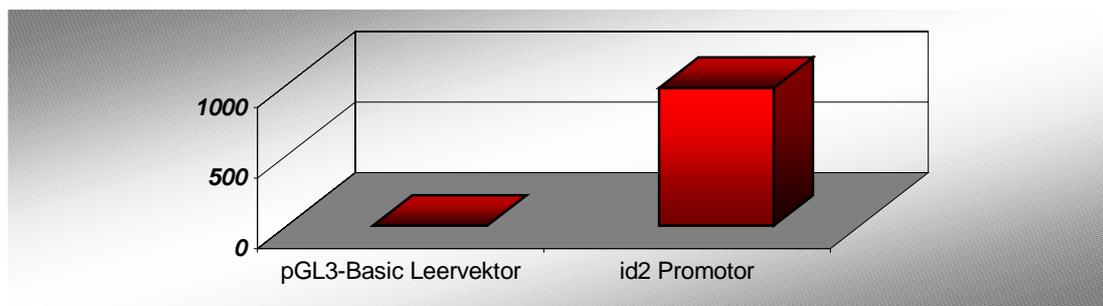


Abbildung 14: Aktivitätsmessung des ID2 Promotors in U937 Zellen mittels Luziferase Assay

Eine Untersuchung des Promotors auf Bindestellen bestimmter Transkriptionsfaktoren (AML1, PU1, SP1, NFY, cEBP α , cEBP β) in der Internet Datenbank Transkription factor Database (Transfac) zeigte spezifische Sequenzen auf, durch die der Promotor möglicherweise reguliert wird. Gefunden wurden drei cEBP α (NFY) Bindestellen (CCAAT, in der Sequenz in rot dargestellt) an den Positionen -79, -116 und -171 in der komplementären Richtung. Eine mögliche Consensus Sequenz für eine AML1 (TGTGGT) Bindestelle ist in der Sequenz nicht vorhanden. In der Sequenz konnten insgesamt drei

potentielle PU1 Bindestelle (GGAAG) lokalisiert werden, deren Positionen hervorgehoben sind. Eine Untersuchung des Promotors auf die Abhängigkeit durch den SP1 Transkriptionsfaktor in S2 Drosophila Zellen zeigte ebenfalls keine spezielle Regulation, allerdings konnten über die Datenbank Bindestellen des SP1 Transkriptionsfaktor in komplementärer Richtung gefunden werden (TRANSFAC Computerdatenbank). Gefunden wurden allerdings einige andere Bindestellen für Transkriptionsfaktoren wie AP2 (6x), AP4 (12x) und GATA1 (8x) und andere. Die Abhängigkeit des Promotors von diesen Transkriptionsfaktoren wurde weiter nicht untersucht.

Der ID2 Promotor wurde weiterhin auf die Regulation durch die Fusionsproteine untersucht. Hierzu wurden je nach Zelllinie unterschiedliche Mengen an Plasmid verwendet. Für die adhärenenten Zelllinien wurde eine Transfektion nach der SuperFect und/oder Kalzium-Phosphat Methode durchgeführt und eine Gesamtmenge von 2,1 µg eingesetzt. Suspensionszellen wurden durch Elektroporation transfiziert. Hierbei wurden Plasmidmengen zwischen 10 µg und 40 µg eingesetzt. Die Untersuchungen wurden mehrfach durchgeführt und auch in verschiedenen Zelllinien (U937, NIH3T3). Die Ergebnisse wurden anschließend gemittelt und die Daten in einem Diagramm dargestellt. Zunächst wurde der Promotor allerdings auf die Regulation durch die Fusionsproteine AML1-ETO und PML-RAR α hin untersucht. Da die Ergebnisse keine Regulation aufzeigten wurde weiterhin auf die Untersuchung des Promotors zur Regulation mit PLZF-RAR α verzichtet.

Tabelle 11: Pipetierschema für die Transfektion von NIH3T3 Zellen. Der pCDNA3.1 Vektor (Ansatz 1) diente als Background und wurde in bei der Berechnung der Werte entsprechend abgezogen.

Ansatz	pCDNA3.1	pGL3-Basic	AML1-ETO	PML-RAR α	AML1	PRL-SV40
1	2,1 µg					--
2	1,0 µg	1,0 µg				100 ng
3		1,0 µg	1,0 µg			100 ng
4		1,0 µg		1,0 µg		100 ng
5		1,0 µg				100 ng
6		1,0 µg			1,0 µg	100 ng

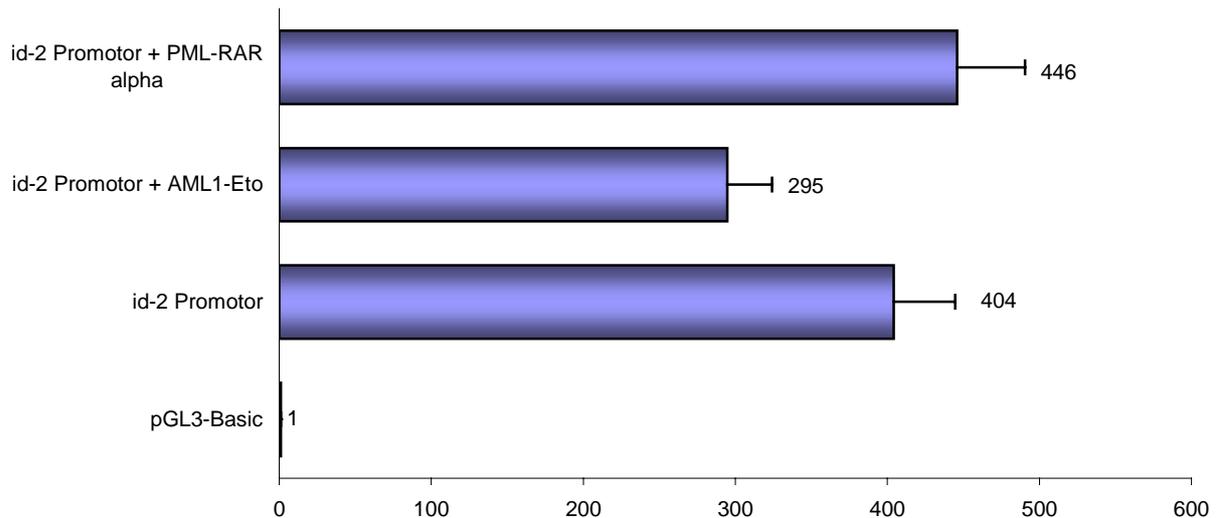


Abbildung 15: Aktivität des ID2 Promotors zusammen mit den Fusionsproteinen in der NIH 3T3 Zelllinie.

Die Aktivität des Leervektors pGL3-Basic wurde gleich eins gesetzt, um die Promotoraktivität besser einschätzen zu können. Die Versuche wurde mehrfach durchgeführt und die Abbildung zeigt die Daten der gemittelten Werte. Die Promotoraktivität wurde durch die Zugabe von AML1 oder PML nicht verändert (hier nicht dargestellt).

3.3 Untersuchung des ID2 Gens

3.3.1 Klonierung des ID2 Gens

Aus der U937 Zelllinie, aber auch aus anderen Zelllinien wurde RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Aus dieser cDNA wurde das ID2 Gen mittels PCR amplifiziert und in den mit BamHI/EcoRI linearisierten pCDNA3.1 Expressionsvektor kloniert. Ebenso wurde das ID2 Gen in den PINCO Vektor kloniert. Der PINCO Vektor wurde mit EcoRI Linearisiert und in einer „End Conversion“ Reaktion blind end geschnitten. Anschließend konnte der Vektor mit BamHI geschnitten werden, so dass zwei unterschiedliche Enden entstanden. Das Insert (ID2 Gen) wurde mit EcoRV/BamHI geschnitten und konnte anschließend in den Vektor ligiert werden. Die erhaltenen Konstrukte

des pCDNA3.1 und des PINCO Vektors wurden für die Transfektionen in die verschiedenen Zelllinien verwendet.

```

GCCCGGTGCC AAGCGCAGCT AGCTCAGCAG GCGGCAGCGG CGGCCTGAGC 50
TTCAGGGCAG CCAGCTCCTC CCGGTCTCGC CTTCCCTCGC GGTTCAGCATG 100
AAAGCCTTCA GTCCCGTGAG GTCCGTTAGG AAAAACAGCC TGTTCGGACCA 150
CAGCCTGGGC ATCTCCCGGA GCAAAACCCC TGTGGACGAC CCGATGAGCC 200
TGCTATACAA CATGAACGAC TGCTACTCCA AGCTCAAGGA GCTGGTGCCC 250
AGCATCCCCC AGAACAAGAA GGTGAGCAAG ATGGAAATCC TGCAGCACGT 300
CATCGACTAC ATCTTGACC TGACAGATCGC CCTGGACTCG CATCCCCTA 350
TTGTCAGCCT GCATCACCAG AGACCCGGGC AGAACCAGGC GTCCAGGACG 400
CCGCTGACCA CCCTCAACAC GGATATCAGC ATCCTGTCCT TGCAGGCTTC 450
TGAATTCCTT TCTGAGTTAA TGTCAAATGA CAGCAAAGCA CTGTGTGGCT 500
GAATAAGCGG TGTTTCATGAT TTCTTTTATT CTTTGCACAA CAACAACAAC 550
AACAAATTCA CGGAATCTTT TAAGTGCTGA ACTTATTTTT CAACCATTTT 600
ACAAGGAGGA CAAGTTGAAT GGACCTTTTT AAAAAGAAAA AAAAAATGGA 650
AGGAAACTA AGAATGATCA TCTTCCCAGG GTGTTCTCTT ACTTGACTG 700
TGATATTCGT TATTTATGAA AAAGACTTTT AAATGCCCTT TCTGCAGTTG 750
GAAGGTTTTT TTTATATACT ATTCCCACCA TGGGGAGCGA AAACGTTAAA 800
ATCACAAGGA ATTGCCCAAT CTAAGCAGAC TTTGCCTTTT TTCAAAGGTG 850
GAGCGTGAAT ACCAGAAGGA TCCAGTATTC AGTCACTTAA ATGAAGTCTT 900
TTGGTCAGAA ATTACCTTTT TGACACAAGC CTAAGTGAATG CTGTGTATAT 950
ATTTATATAT AAATATATCT ATTTGAGTGA AACCTTGTGA ACTCTTTAAT 1000
TAGAGTTTTT TTGTATAGTG GCAGAGATGT CTATTTCTGC ATTCAAAGT 1050
GTAATGATGT ACT 1100

```

Die Primer Sequenzen zur Amplifizierung des ID2 Gens sind in Fett dargestellt und das Start ATG sowie das Stop Codon TAA in rot. Das Gen hat eine Größe von insgesamt 409 bp und das Protein besteht aus 133 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 14,8 kDa. Der PI Wert des Proteins liegt bei 7,99 (ExpASy Molecular Biology Server).

Aminosäuresequenz des ID2 Gens:

```

MKAFSPVRSV RKNSLSDHSL GISRSKTPVD DPMSLLYMN DCYSKLELV 50
PSIPQNKKVS KMEILQHVID YILDQLIALD SHPTIVSLHH QRPQONQASR 100
TPLTTLNTDI SILSLQASEF PSELMSNDSK ALCG 150

```

Zur Kontrolle wurde ein Δ ID2 Konstrukt aus einem Vektor mittels PCR amplifiziert. In diesem Konstrukt fehlen 120 bp in der Helix-loop-Helix Region des ID2 Gens, so dass ein inaktives Protein entsteht. Das Δ ID2 Konstrukt wurde aus dem LZRSpBMN-linker-IRES-EGFP Vektor (12443 bp; konstruiert von A. Q. Bakker; 1996) mittels PCR amplifiziert und in den pCDNA3.1 kloniert.

Die Expression des ID2 Gens wurde in U937 Zellen, die induzierbar mit den Fusionsproteinen transfiziert waren in einer Westernblot Analyse untersucht. Es wurde hierzu ein Antikörper gegen ID2 verwendet. In dem Westernblot (siehe Abbildung) ist deutlich zu sehen, dass die Expression des ID2 Proteins durch die Fusionsproteine reprimiert wird. Der stärkste Effekt ist durch das Fusionsprotein PLFZ-RAR α zu beobachten.

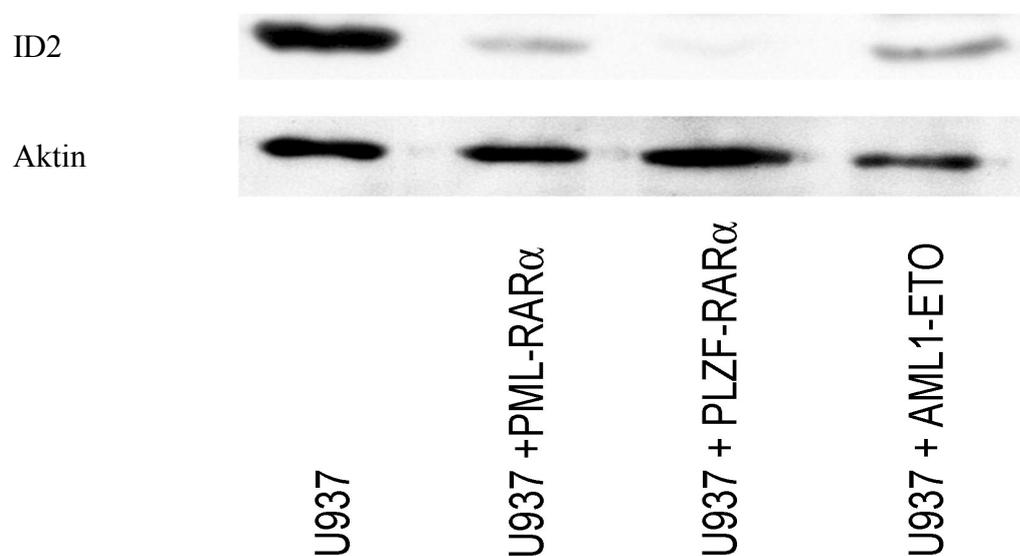


Abbildung 16: Westernblot zur Untersuchung der ID2 Expression in U937 Zellen. Es ist deutlich zu sehen, dass ID2 durch die Fusionsproteine reprimiert wird. Als Referenz wurde ein Aktin-Blot mitgeführt.

3.3.2 Kolonie-Assay des ID2 Gens

Für das ID2 Gen und für die Deletionsmutante des ID2 Gens wurde ein Kolonie Assay durchgeführt. Das ID2 Gen und das Δ ID2 Gen wurden mit in einer gesamt DNA Menge von 10 μ g in die 32D Zelllinie transfiziert und ein Kolonie-Assay durchgeführt. Für die Durchführung des Kolonie Assays wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen in einem Gesamtvolumen von 460 μ l eingesetzt. Bei der Auszählung der Kolonien wurde die Gesamtzahl an Kolonien ausgezählt.

Tabelle 12: Ausgezählte Kolonien der ID2 transfizierten 32D Zellen nach 12 Tagen Wachstum.

	A	B	C	Mittelwert	Standardabweichung
pCDNA3.1	128	229	411	256	143
ID2	118	224	172	171	53
ID2 + AML1-ETO	254	175	389	272	108
Δ ID2	461	310	252	341	107

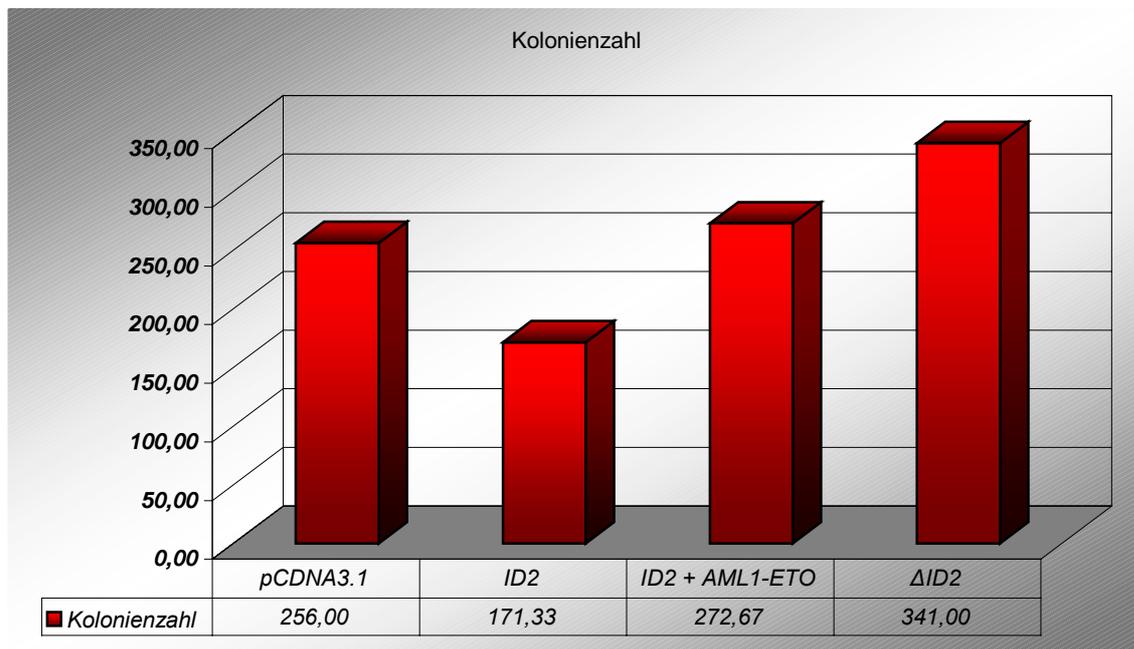


Abbildung 17: Prozentualer Anteil der aus 32-D Zellen gebildeten Kolonien

Die Abbildung zeigt, dass durch die Expression von ID2 die Anzahl an Kolonien sinkt. Durch die Zugabe des Fusionsproteins AML1-ETO steigt die Kolonienzahl wieder an, da das Fusionsprotein die Expression des ID2 Gens reprimiert. Die Transfektion von Δ ID2 dem die

Helix-loop-Helix Domäne fehlt und damit keine Funktion mehr besitzt, zeigt eine leicht erhöhte Kolonienzahl.

3.4 Untersuchungen zum Plakoglobin Gen (γ -Catenin)

Von den untersuchten Genen unter dem Einfluss der Fusionsproteine gehört Plakoglobin (γ -Catenin) zu der Gruppe, die in den U937 Zelllinien mit den Fusionsproteinen stärker exprimiert wurden. Die Untersuchungen durch die Real-Time RT-PCR bestätigten dieses Ergebnis. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen des Proteins (B. Steffen) wie auch der Promotorsequenz des Plakoglobins durchgeführt.

Um den Einfluss der Fusionsproteine auf die Expression des Plakoglobins im Westernblot nachzuweisen wurde eine induzierbare U937 Zelllinie verwendet die durch die Zugabe von Zn^{2+} (0,1 M) das entsprechende stabil transfizierte Fusionsprotein exprimiert.

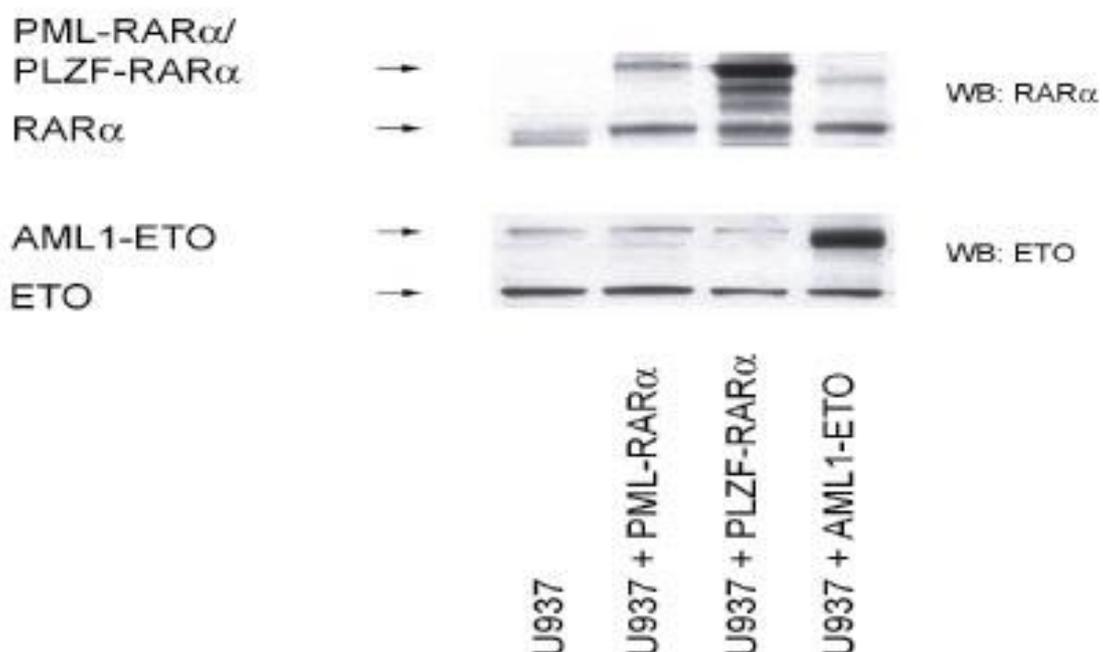


Abbildung 18: Westernblot Analyse der induzierten U937 Zelllinie auf die Expression der Fusionsproteine. Im oberen Teil wurde ein Antikörper gegen RAR α verwendet und zeigt zum einen die Expression des RAR α sowie die Bildung der Fusionsproteine PML-RAR α und PLZF-RAR α . Der untere Teil des Westernblots (WB) zeigt die Expression des Transkriptionsfaktors ETO allein sowie die Bildung des Fusionsproteins AML1-ETO in der induzierten Zelllinie. Als Referenz kann hier die ETO bzw. die RAR α Banden angesehen werden.

In diesen induzierten Zelllinien wurde nun ein Westernblot auf die Expression von Plakoglobin durchgeführt.

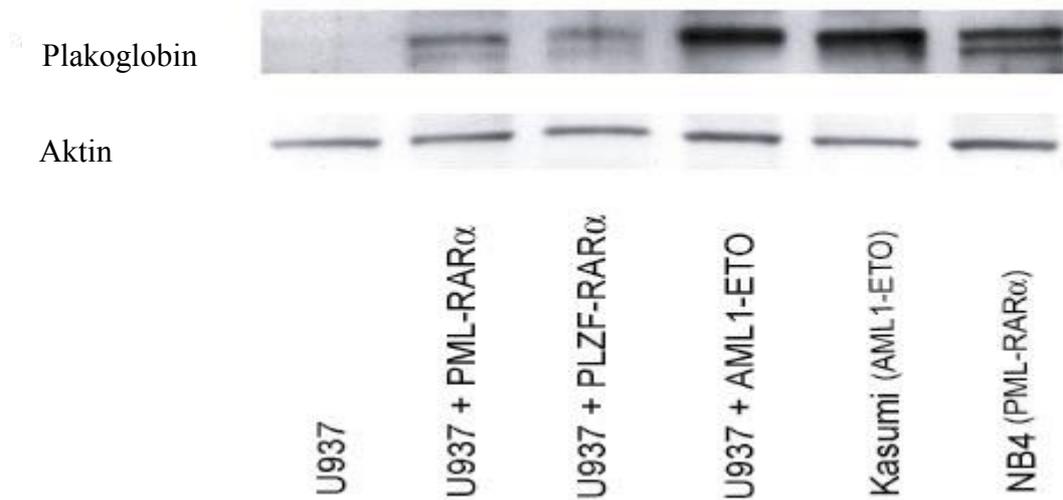


Abbildung 19: Westernblot Analyse der Zn^{2+} (0,1 M) induzierten U937 Zelllinie auf die Expression des Plakoglobins. Zusätzlich wurde die Kasumi Zelllinie verwendet, die das Fusionsprotein AML1-ETO endogen exprimiert sowie die NB4 Zelllinie, die das Fusionsprotein PML-RAR α exprimiert. Als Referenz wurde hier ein Aktin-Blot durchgeführt, um zu zeigen, dass überall gleiche Proteinmengen verwendet wurden.

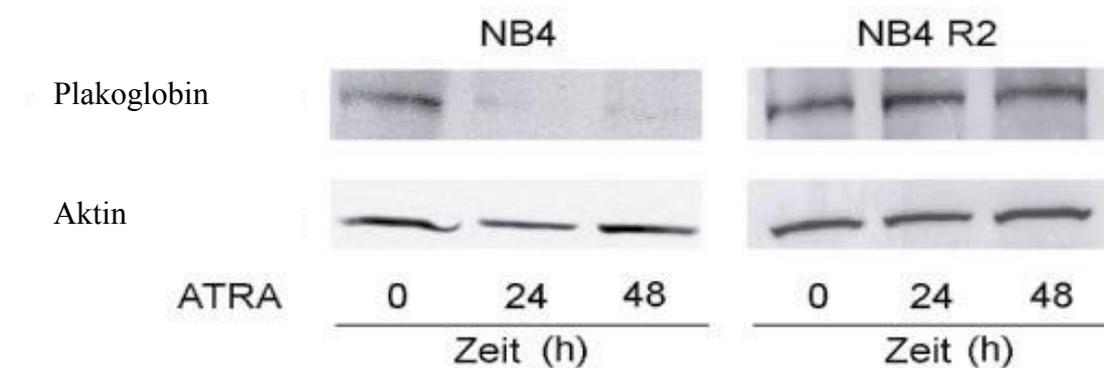


Abbildung 20: Untersuchung der Expression von Plakoglobin (γ -Catenin) in NB4 und NB4-R2 Zellen über 48 Stunden. Als Referenz wurde wiederum ein Aktin-Blot durchgeführt.

Auf dem Westernblot ist zu erkennen, dass im Vergleich zur U937 Kontrolle alle Zelllinien das Plakoglobin stärker exprimieren, die Zelllinien die das Fusionsprotein AML1-ETO bilden zeigen eine allerdings eine stärkere Expression des Plakoglobins auf Proteinebene.

Als weiteres wurden wiederum NB4 Zellen, die bereits das Fusionsprotein PML-RAR α exprimieren, auf die Expression von Plakoglobin untersucht. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 48 Stunden mit ATRA (all trans Retinoinsäure) behandelt und nach 0, 24 und 48 Stunden eine Probe für eine Westernblot Analyse entnommen.

Das Ergebnis zeigt zu Beginn die Expression des Plakoglobins in den NB4 Zellen. Durch die Zugabe von ATRA geht nach bereits 24 Stunden die Bildung des Plakoglobins zurück. Die NB4-R2 Zelllinie ist eine NB4 Zelllinie die ebenfalls das PML-RAR α exprimiert. Der Unterschied liegt allerdings in dem entstandenen Produkt. Das Fusionsprodukt der NB4-R2 Zelllinie weist eine Mutation auf, so dass eine Resistenz gegen die Behandlung mit ATRA entsteht. Die Abbildung 20 zeigt deutlich, dass über einen Zeitraum von 48 Stunden die Expression von Plakoglobin durch die Zugabe von ATRA nicht reprimiert werden kann.

Das Plakoglobin Gen wurde in einen Expressionsvektor kloniert (Drs. Zhurinsky and Ben-Ze'ev, Israel) und in 32-D Zellen stabil transfiziert (B. Steffen). Die stabil transfizierten 32-D Zellen wurden anschließend syngenen C3H Mäusen in einer Menge von 10^5 Zellen pro Maus in einem Volumen von 150 μ l intra Venös injiziert.

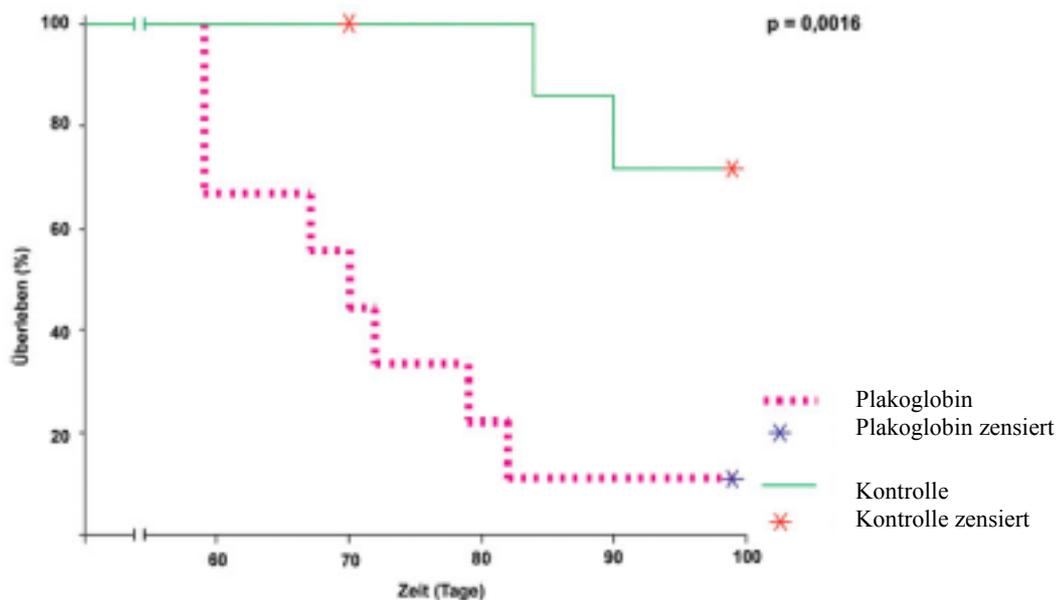


Abbildung 21: Überlebensrate der mit den transfizierten 32-D Zellen injizierten Mäusen.

Für diesen Versuch wurden 10 Mäuse, mit Plakoglobin transfizierten 32-D Zellen gespritzt, sowie einer Kontrollgruppe von ebenfalls 10 Tieren mit 32-D Zellen, die mit dem pCDNA3.1 Leervektor transfiziert waren. Das Diagramm gibt die Überlebensrate der Mäuse in Prozent wieder. Wie bei der Zellenbeschreibung erwähnt, weist die 32-D Zelllinie bereits einen

genetischen Defekt auf. Das Ergebnis in dem Diagramm zeigt, dass der Defekt nicht dazu führt, dass die Tiere bereits an den injizierten 32-D Zellen sterben. Zusammen mit dem stabil transfizierten Plakoglobin Gen starben die Tiere innerhalb von 80 Tagen. An bestimmten Zeitpunkten wurden Kontrollen genommen (zensiert) und die Tiere untersucht. Bei den gestorbenen und auch bei den getöteten Tieren wurden die Organe sowie das Knochenmark entnommen und auf pathologische Veränderungen hin untersucht.

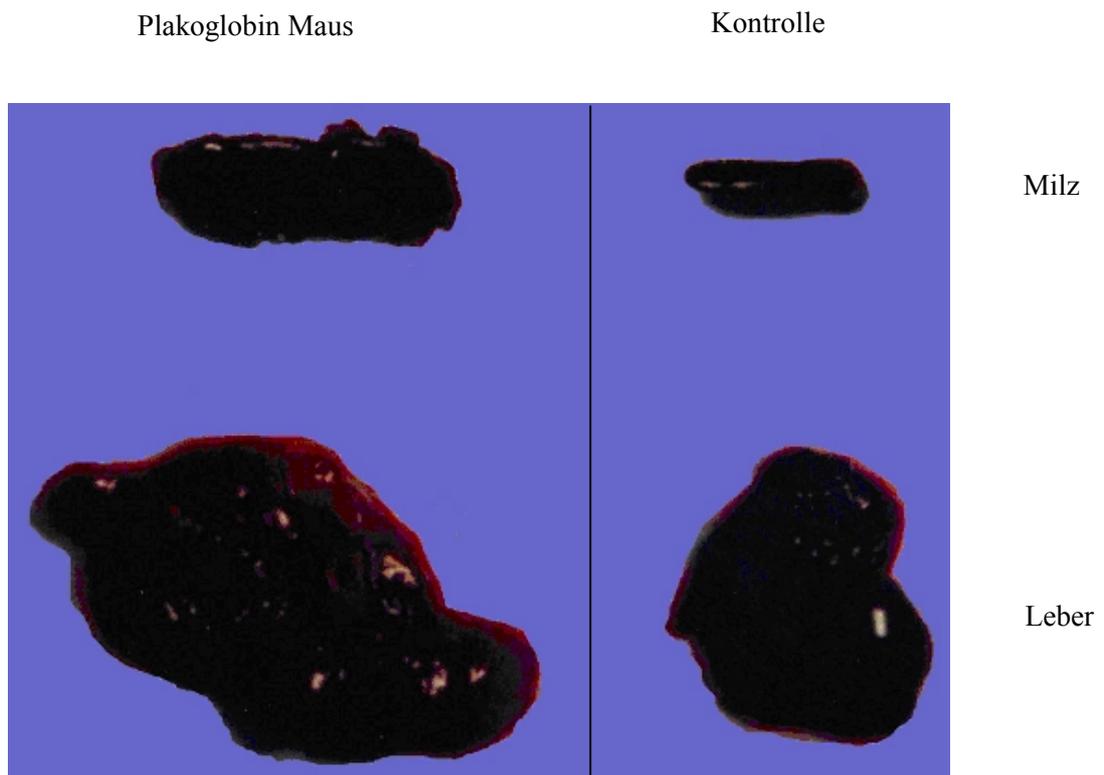


Abbildung 22: Fotografie der entnommenen Organe einer Kontrollmaus und einer Maus in die Plakoglobin transfizierte 32-D Zellen injiziert wurden.

Die Fotografie zeigt deutliche Unterschiede in der Größe der Organe. Leber und Milz sind bei der „Plakoglobin Maus“ deutlich vergrößert. In der Pathologie des Universitäts-Klinikum-Münster (Frau Prof. Dr. Köhler) wurden die Mäuse auf Organveränderungen hin untersucht.

3.4.1 Klonierung des Plakoglobin Promotors

Um herauszufinden, welche Region des Promotors für die Regulation von Bedeutung ist, wurde der Promotor des Plakoglobins (Potter, Braun et al. 2001) aus chromosomaler DNA von U937 Zellen mittels PCR amplifiziert und in die KpnI/Bgl II Schnittstellen des pGL3-Basic Luziferase Vektors kloniert.

```

CTGGTTTGGT GGTCCTTCAA ATGAGAGGAA GGAGGTTCTA GCTTGGGGTG    50
TGCCACTTTG TAGTTTTGTG ACTTCTCTGA ACTTCGGTTT CTTCATCTTT    100
ACAATGAGGG TCGTTTTTCTC ATCCTAACTA TTTTTCAGAG CTGTCACAAT    150
AATTAATAAAA AAACATAACCG TTAATTTAAA TTTCTAACCT TTAGCAGTTT    200
CTGAGTGCTT TCACAAACCT GACCTCATTT AATCCCCACA TACTCCAGTG    250
AGGTAGATAT GGCTAATGTA TCCAGTTTAC AGAAGAGGAG AAACAGGGTG    300
AAGTAACTTG CCTAAAATCA TACCAAGTGG GAGAAGACCA AACCTGGCCT    350
TCTAATTCTA AATCCCAGGA GTACTCCATC TTTCGGGAAA AAAATCCCAC    400
CCCAGCACAA AGCCTATGAA ATGCTATAACA AATATGTGAT TACTACTTTG    450
GGGCAAGGAT GAATAAGCCC AAAGAAGCAT CATGCCTGAC GCTGAGTTGG    500
CTGGCCGGTG AAGGCGTCTG TCCCTTCCCT TGGTATCCCT ATGACTTACC    550
TGTTGGACAG GTAGGGGGAA GGGGAGAGTA ATGAGTCTCA CCTGCTCAGA    600
GCAAGGGTGG GGCAAGACAC ACCCCATCCC TTCCATTGGT TTTTTCCTTA    650
GTCTTACTGA CAGAGCCTTG TCCAATCAGG AGGAAGTAAC TTTCTATCTG    700
CCAATAGATG CAATGTTAGG ATGAGACCTC AAGTTAGAGT CCATCCCTAG    750
AGCCGACTGG CAGTCCCCGG GGCCAATGGC AAGCGGATAA ACAGAGGCGG    800
CCGTGGAAGA GGACTGGAGG CGAGGCTCCG CCCCTCCACG GGACAGTCAG    850
GCGAGATAGC CAGTGAGCTC GCACCAGAGG GTGGGCGTCT CCCCCAGGGG    900
CGGAGCTTCG AAGTGCGGAG GGGCGTGGCT TGGCTGTCAG GTCTCTTCGC    950
CTTTTGTTCG GTTACTGAGT TGCTGCCTTG GCCAGAGTCC GGAGCAGCCG 1000
ccgccccgacc gcgcccagact cagttc                                1050

```

Das klonierte Plakoglobin Promotor Fragment hatte eine Größe von 977 bp. Die Primersequenz zur Amplifizierung des DNA-Fragmentes sind in Fett dargestellt. Der Transkriptionsstartpunkt ist rot markiert. Die Aktivität des DNA-Fragmentes in dem pGL3-Basic Luziferase Vektor wurde in Hela Zellen getestet und zeigte, dass es sich um eine Promotorsequenz handelt.

Aus diesem Promotorfragment wurden nun durch den Einsatz der Restriktionsenzyme KpnI/SmaI bzw. SmaI/BglII kürzere Fragmente hergestellt. Die SmaI Schnittstelle ist in rot markiert und unterstrichen. Um die Richtigkeit der Promotorfragmente festzustellen wurden alle Fragmente Sequenziert.

Der Plakoglobin Promotor zeigte in einem Luziferase Assay, dass eine Regulation durch das Fusionsprotein AML1-ETO stattfindet. Aus diesem Grund wurden weitere kürzere Fragmente des Promotors hergestellt um den Bereich zu lokalisieren die für die Regulation verantwortlich ist. Um zu gewährleisten das alle Promotorfragmente das gleiche 5'ende besitzen, wurden entsprechende „Forward“ Primer mit einer KpnI Schnittstelle konstruiert und gerichtet in den entsprechend linearisierten pGL3-Basic Luziferase Vektor kloniert.

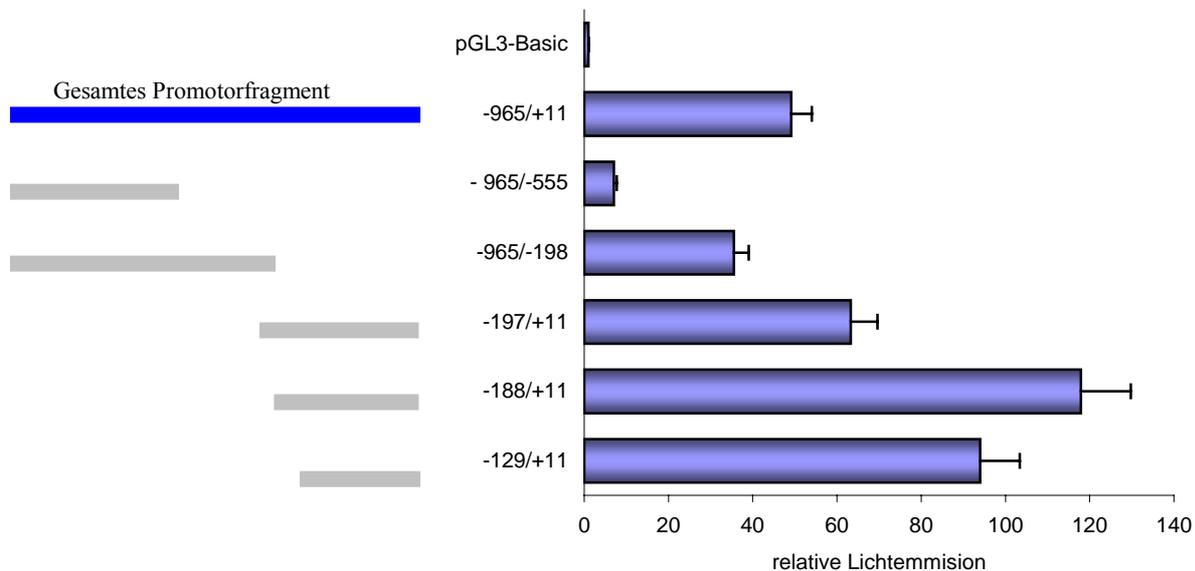


Abbildung 23: Promotoraktivitäten der verschiedenen konstruierten Fragmente im Luziferase Assay und ihre Lage zum Gesamtfragment. Die Transfektion wurde in Hela Zellen durchgeführt. Zur Kontrolle und Aktivitätsbestimmung wurde der pGL3-Basic Leervektor transfiziert.

Alle Promotorfragmente wurden auf ihre Regulation durch die Fusionsproteine getestet. Dabei hat sich gezeigt, dass die Regulation durch das Fusionsprotein AML1-ETO am stärksten ist. Eine Regulation durch die Fusionsproteine PML-RAR α oder PLZF-RAR α konnte nicht festgestellt werden. Daher wurden alle weiteren Versuche nur mit dem Fusionsprotein AML1-ETO durchgeführt. Zwischen -188 und -129 wurden weitere drei Fragmente hergestellt. Das Promotorfragment -178/+11 zeigte Promotoraktivität aber keine

zusätzliche Regulation durch das Fusionsprotein. Die weiteren Promotorfragmente $-162/+11$ und $-146/+11$ aus diesem Bereich zeigten keine Promotoraktivität und auch eine zusätzliche Regulation durch das Fusionsprotein AML1-ETO wurde auch bei diesen Fragmenten nicht festgestellt (hier nicht dargestellt). Promotoraktivität sowie eine sehr schwache Regulation durch das Fusionsprotein ist erst wieder in dem Fragment $-129/+11$ zu erkennen. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Promotorfragmente $-178/+11$, $-166/+11$ und $146/+11$ nicht verwendet.

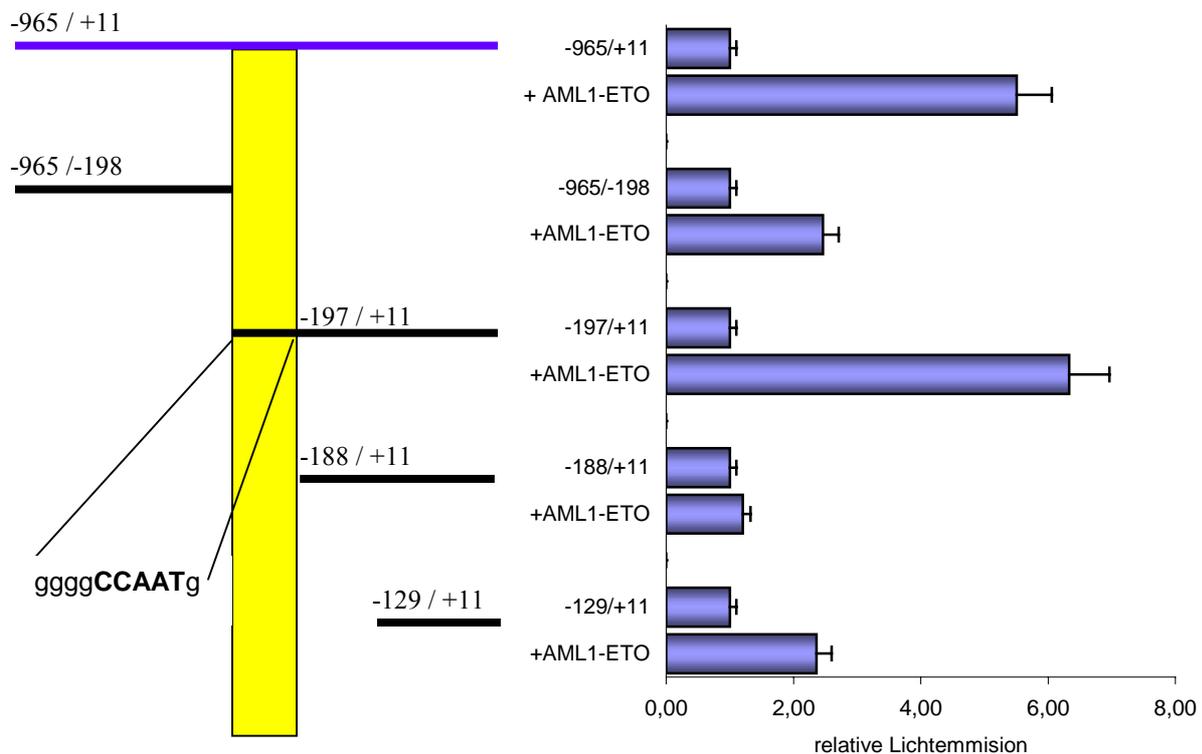


Abbildung 24: Aktivität der verschiedenen Promotorfragmente zusammen mit dem Fusionsprotein AML1-ETO. Die Transfektion der Fragmente wurde in Hela Zellen durchgeführt. Die Aktivität der Promotorfragmente wurde eins gesetzt um die zusätzliche Regulation durch das Fusionsprotein hervorzuheben.

Die Abbildung 25 zeigt 5' Deletionen der Promotorsequenz von Plakoglobin und enthält eine 10 bp Nukleotidsequenz (-197 bis -188), die die AML1-ETO Induktion vermittelt. Diese Region war Gegenstand weiterer Untersuchungen des Promotorfragmentes. Zusätzlich mit entsprechenden Überhängen der Restriktionsschnittstellen KpnI und BglII wurden Oligonukleotide hergestellt, welche die 10 bp Region dreimal hintereinander geschaltet enthalten (siehe Seite 50). Die Oligonukleotide wurde gekocht (5 min) und langsam auf

Raumtemperatur abgekühlt um ein Zusammenlagern der Nukleotide zu gewährleisten. Anschließend wurden die Oligos in den pGL3-Basic-TK Luziferase Vektor (siehe Seite 48) kloniert. Der „pGL3-Basic-TK-Oligo“ wurde in die Hela Zelllinie transfiziert und in einem Luziferase Assay getestet. Es wurde erwartet, dass die Promotoraktivität zusammen mit dem Fusionsprotein AML1-ETO eine wesentlich höhere Aktivität zeigt als der pGL3-Basic-TK Vektor oder gar als das eigentliche Fragment -197/+11. In dem anschließenden Luziferase Assay zeigte sich, dass das Oligonukleotid mit der dreifach hintereinander geschalteten 10 bp Region des Plakoglobin Promotors keine höhere Aktivität aufweist auch nicht zusammen mit dem Fusionsprotein AML1-ETO.

Die in Hela Zellen gemessenen Daten wurden in der myeloischen 32-D Mauszelllinie überprüft.

Tabelle 13: Luziferase Assay der Promotorfragmente -197/+11 und -188/+11 zusammen mit und ohne dem Fusionsprotein AML1-ETO.

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittelwert	Standardabweichung
PGL3-Basic	1	1	1	1	0
-197/+11	10,65	18,44	17,16	15,42	4,17
+AML1-ETO	39,64	66,70	63,14	56,49	14,71
-188/+11	14,77	9,05	13,30	12,37	2,97
+AML1-ETO	15,16	23,96	11,06	16,73	6,59

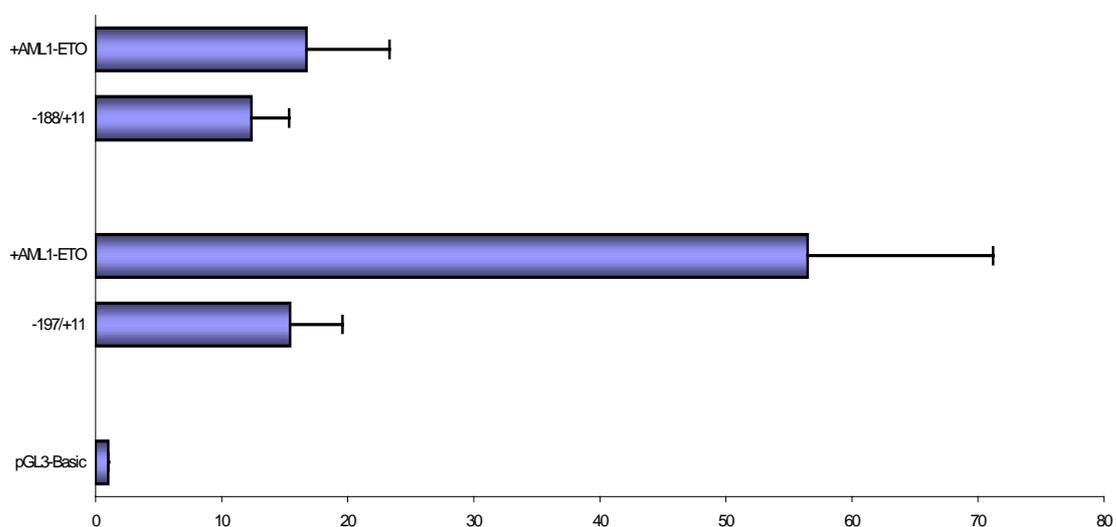


Abbildung 25: Messung der Promotoraktivitäten in den Fragmenten -197/+11 und -188/+11 zusammen mit dem Fusionsprotein AML1-ETO in 32-D Zellen.

Tabelle 14: Bindestellen für Transkriptionsfaktoren in einem 213 bp Plakoglobin Promotor-fragment (-201/+11). Das (+) oder (-) Zeichen gibt die jeweilige Richtung an.

Transkriptionsfaktor	Promotor-Sequenz	Bindesequenz
Cellular and viral CCAAT box elements	4 (+)	cggggCCAAtgg
Nuclear factor Y binding factor (NFY)	4 (+)	cggggCCAAtggcaag
Nuclear factor Y binding factor (NFY)	6 (+)	gggCCAAtggc
Nuclear factor 1 (NF1)	10 (+)	caaTGGCaagcggataaa
GATA-binding-factor 1	17 (+)	aagcgGATAaacag
Fork head related activator-2	18 (+)	agcgggTAAAcagagg
Fork head related activator-7	18 (+)	agcgggTAAAcagagg
GATA-binding-factor 1 (GATA1)	19 (+)	gcgGATAaac
GATA-binding-factor 2 (GATA2)	19 (+)	gcgGATAaac
GATA-binding-factor 3 (GATA3)	19 (+)	gcgGATAaac
Complex of Lmo2 bound to Tal-1 (LMO2COM)	20 (+)	cgGATAaac
Xenopus fork head domain factor 2 (XFD2)	20 (+)	cggaTAAAcagagg
HNF-3 / Fkh Homolog-8 (HFH8)	20 (-)	ctcTGTTatccg
HNF-3 / Fkh Homolog-3 (HFH3) (=Freac-6)	20 (-)	ctcTGTTatccg
Cellular and viral CCAAT box elements	21 (+)	GgaTAAAcagaggcg
GATA binding site (GATA_C)	21 (+)	gGATAAacaga
c-Ets-1 (p54) (CETS1p54)	49 (+)	acTGGAggcg
GC box elements (GC)	59 (-)	gaggGGCGgagcct
Stimulating protein 1 (SP1)	60 (-)	gaggGGCGgagcc
N-MYC	70 (-)	tgcccGTGgag
Upstream stimulating factor (USF)	71 (+)	tcCACGggac
Ikaros 2 (IK2)	72 (+)	ccacGGGAcagt
USF binding site (USF_C)	72 (-)	tCCCGTgg
Activator protein 1 (AP1FJ)	77 (-)	ccTGACgtcc
TCF11	82 (+)	GTCAggcgagata
Nuclear factor 1 (NF1)	84 (-)	cacTGGCtatctcgctg
GATA binding factor 1 (GATA1)	86 (+)	ggcgaGATAgccag
GATA binding factor 1 (GATA1)	87 (+)	gcgaGATAgccag
Complex of Lmo2 bound to Tal-1 (LMO2COM)	89 (+)	gaGATAgcc
GATA binding site (GATA_C)	90 (+)	aGATAGccagt
Cellular and viral CCAAT box elements	91 (+)	gatagCCAGtga
Nuclear factor Y (NFY)	93 (+)	tagCCAGtgag
Egr-2/Krox-20 early growth response gene (ERG2)	113 (+)	gaGGGTgggcgt
Ikaros 2 (IK2)	122 (-)	ctggGGGAgacg
Activator protein 2 (AP2)	125 (+)	ctCCCCcagggg
Myeloid zinc finger 1 (MZF1)	126 (-)	ctgGGGGa
Activator protein 2 (AP2)	127 (+)	ccCCCAGgggcg
Activator protein 2 (AP2)	127 (-)	cgCCCCtggggg
Stimulating protein 1 (SP1)	131 (+)	caggGGCGgagct
GC box elements	131 (+)	caggGGCGgagctt
DeltaEF1	144 (-)	cgccACCTcga
Nuclear factor 1 (NF1)	147 (+)	aggTGGCgagggcgctgg
Aryl hydrocarbon receptor (AHRARNT)	151 (+)	ggcgaggggCGTGgct
Stimulating protein 1 (SP1)	154 (+)	gaggGGCGtgct
GC box elements	154 (+)	gaggGGCGtgctt
Nuclear factor 1 (NF1)	164 (+)	gctTGGCgtcaggtctc
Activator protein 1 (AP1)	167 (-)	ccTGACagcca
Activator protein 1 (AP1FJ)	167 (-)	ccTGACagcca
DeltaEF1	172 (-)	agagACCTgac
TCF11	172 (+)	GTCAggtctcttc
Barbiturate-inducible element (BARBIE)	180 (-)	aacaAAAGcgaaga
Sex-determining region Y gene product (SRY)	186 (-)	ccgaACAAaagg
v-myb	193 (-)	agtAACCgaa
X-box binding protein (RFX1)	195 (-)	cagcaactcaGTAAccg
Upstream stimulating factor (USF)	94 (-)	ctCACTggct
CP2	103 (+)	gctcgcaCCAG
Activator protein 2 (AP2)	108 (-)	caCCCTctggtg

Die 10 bp Region des Promotors wie auch die angrenzende 5'Region und die Sequenz bis zum Transkriptionsstartpunkt wurde auf Bindestellen von Transkriptionsfaktoren mit dem „MatInspector“ Programm untersucht (siehe Tabelle 14).

Das eine Transkriptionsfaktor-Bindestelle in der o.a. Tabelle aufgeführt ist bedeutet nicht zwangsläufig, dass dieser Transkriptionsfaktor auch für die Regulation bedeutsam ist. Umgekehrt kann es aber auch sein, dass ein Transkriptionsfaktor in der Tabelle nicht aufgeführt ist, weil das Computerprogramm möglicherweise nach einer sehr spezifischen Sequenz gesucht hat, die nicht vorhanden ist. Der entsprechende Transkriptionsfaktor verfügt aber möglicherweise über weitere Bindesequenzen, die dem Programm jedoch nicht bekannt ist. Es ist daher notwendig nach entsprechenden Hinweisen durch das Computerprogramm weitere Untersuchungen nach nahe liegenden Faktoren durchzuführen.

Innerhalb der durch AML1-ETO regulierten 10 bp Region befindet sich eine CCAAT Nukleotidsequenz. Diese Sequenz stellt für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren eine zentrale Bindesequenz dar (z.B. cEBP α , NFY usw.). Der Einfluss derartiger nicht aufgeführter Transkriptionsfaktoren wurde mittels Luziferase Assay durchgeführt. Untersucht wurden cEBP α und cEBP β (Phil Koeffler, Los Angeles) zusammen mit dem Plakoglobin Promotorfragment -197/+11.

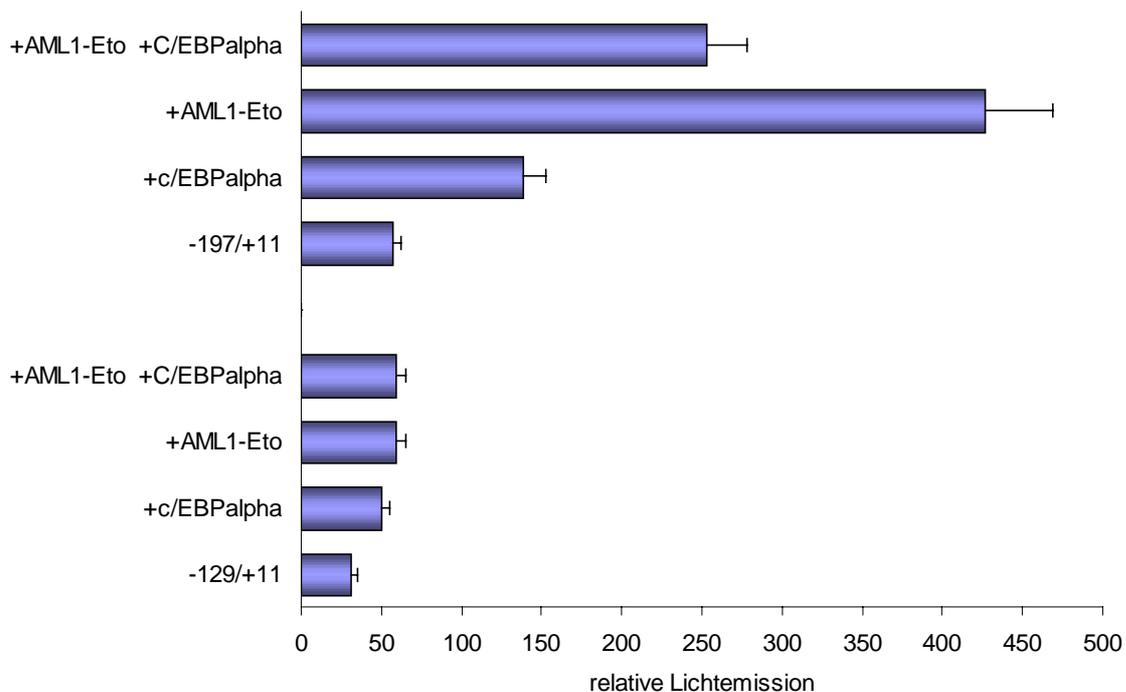


Abbildung 26: Regulation des Plakoglobin Promotors durch AML1-ETO und cEBP α .

Bei dem Promotorfragment -197/+11 ist eine leichte Regulation durch den Transkriptionsfaktor cEBP α zu erkennen. Durch Zugabe von cEBP α zusammen mit dem Fusionsprotein AML1-ETO ist eine Verringerung der Promotoraktivität in der Regulation durch das Fusionsprotein AML1-ETO zu beobachten. Dies ist dadurch bedingt, dass cEBP α durch AML1-ETO reprimiert wird (Westendorf, Yamamoto et al. 1998). Diese Regulation endet bei den Promotorfragmenten, die die 10 bp Region nicht mehr besitzen und daher auch keine CCAAT Sequenz. Die Untersuchung zur Regulation durch cEBP α lässt vermuten, dass durch die Zugabe von c/EBP α die zusätzliche Regulation des Promotors durch AML1-ETO möglicherweise unterdrückt werden kann. Daher wurden Anschlussversuche mit c/EBP α in unterschiedlichen Konzentration durchgeführt. Um den Einfluss auf den Promotor zu untersuchen wurde das Promotorfragment (-197/+11) zusammen mit c/EBP α ohne Zugabe des Fusionsproteins AML1-ETO transfiziert. Weiterhin wurden unterschiedliche Mengen an c/EBP α bei immer gleicher Konzentration an AML1-ETO transfiziert. Der gleiche Versuch wurde mit dem Promotorfragment (-197/+11; mut3) durchgeführt bei dem die CCAAT Sequenz in die Sequenz CCTTA mutiert wurde (siehe Tabelle 4).

Tabelle 15: Messung der unterschiedlichen c/EBP α Mengen mit dem Plakoglobin Promotorfragment (-197/+11). Die Nummern 5-8 enthielten zusätzlich das Fusionsprotein AML1-ETO (1 μ g).

Nr.	Vektor	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittelwert	Standardabweichung
1	pGL3-Basic	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00
2	-197/+11	9,74	18,02	17,16	14,97	4,27
3	+c/EBP α (1 μ g)	24,10	28,22	32,64	28,32	4,27
4	+AML1-ETO (1 μ g)	61,51	67,79	63,14	63,90	10,23
5	+c/EBP α (0,5 μ g)	54,25	27,64	65,90	53,42	8,24
6	+c/EBP α (1 μ g)	45,06	24,41	76,76	48,74	24,01
7	+c/EBP α (2 μ g)	46,02	28,27	70,42	48,24	24,51
8	+c/EBP α (3 μ g)	38,98	33,52	60,31	44,27	19,61

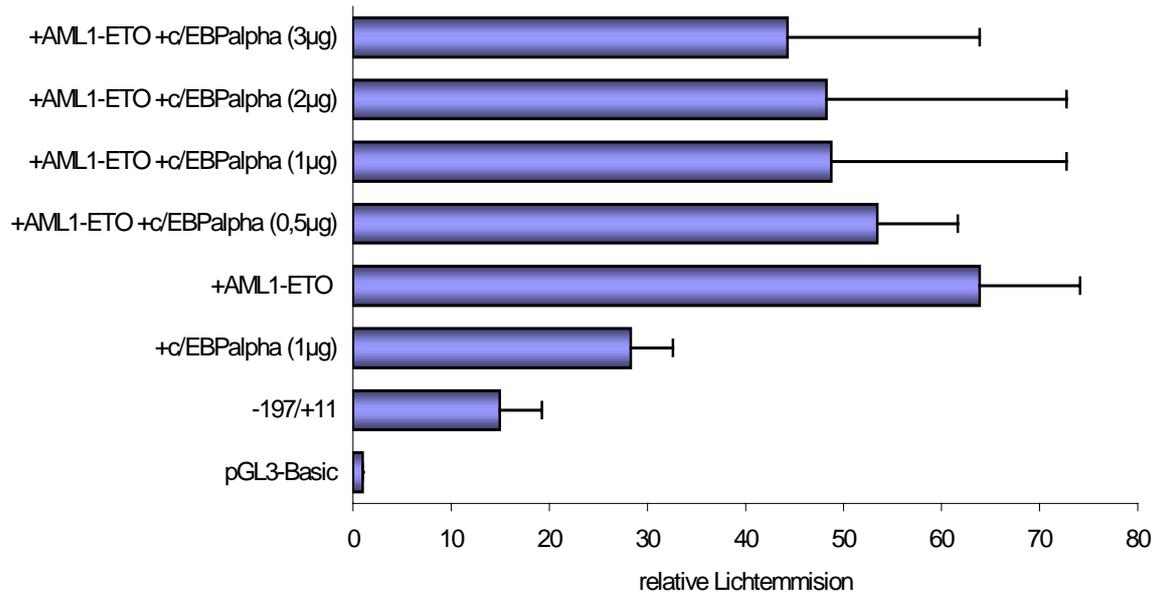


Abbildung 27: Regulation des Promotors durch das Fusionsprotein AML1-ETO in Abhängigkeit durch unterschiedlichen Konzentrationen an c/EBP α .

In den Messungen, die auf den pGL3-Basic Leervektor normiert wurden, war zu erkennen, dass durch die Zugabe von c/EBP α die zusätzliche Regulation durch das Fusionsprotein geringer war. Es war jedoch nicht möglich durch höhere Zugaben von c/EBP α die zusätzliche Aktivierung des Promotors durch das Fusionsprotein AML1-ETO ganz auszuschalten. Um die Funktion der CCAAT Sequenz innerhalb des Plakoglobin Promotors (-197/+11) auf die Regulation durch c/EBP α zu testen, wurde der gleiche Versuch mit der Mutante 3 durchgeführt, bei der die CCAAT Sequenz vollständig mutiert ist.

Tabelle 16: Messung der unterschiedlichen c/EBP α Mengen mit der Mutation 3 (siehe Abb.:29) des Plakoglobin Promotors. Die Nummern 5-8 enthielten ebenfalls zusätzlich jeweils 1µg des Fusionsproteins AML1-ETO.

Nr.	Vektor	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittelwert	Standardabweichung
1	pGL3-Basic	1,00	1,00	1,00	1,00	0
2	-197/+11 (mut 3)	21,43	21,15	17,48	20,02	2,20
3	+c/EBP α (1µg)	31,61	19,75	20,54	23,97	6,63
4	+AML1-ETO (1µg)	72,98	63,99	31,58	56,18	21,78
5	+c/EBP α (0,5µg)	39,97	47,74	40,48	42,73	4,35
6	+c/EBP α (1µg)	52,79	49,00	39,69	41,16	7,21
7	+c/EBP α (2µg)	50,12	35,67	49,05	44,95	8,05
8	+c/EBP α (3µg)	43,48	48,48	53,39	48,45	4,95

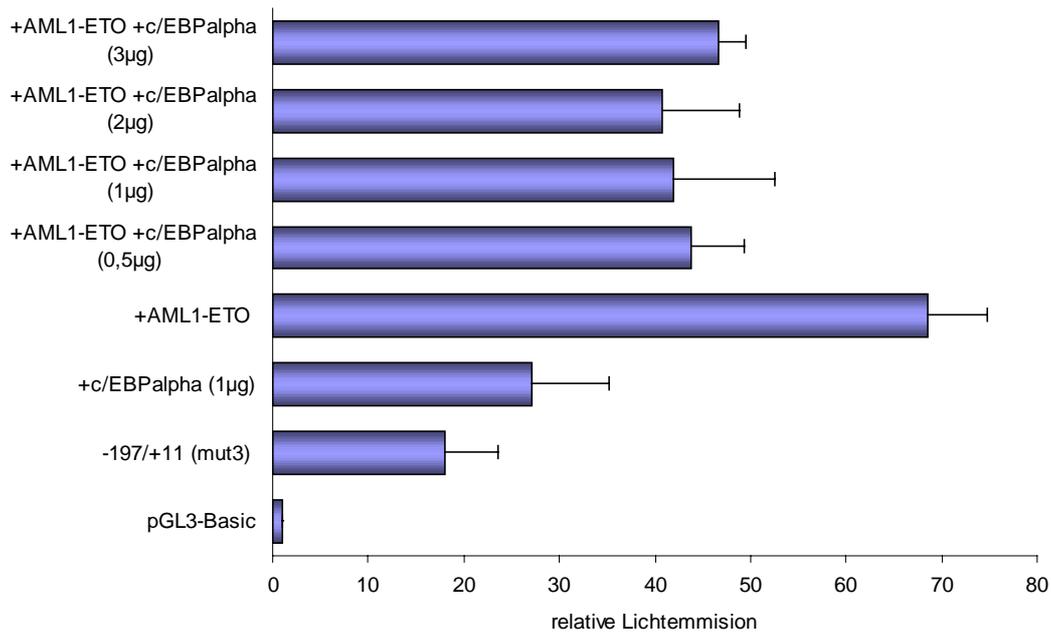


Abbildung 28 : Untersuchung der Mutante 3 des Promotorfragmentes durch Regulation mit c/EBP α

Die Aktivität des Promotorfragmentes zusammen mit AML1-ETO sowie unterschiedliche Konzentrationen an c/EBP α zeigen die Unabhängigkeit von der CCAAT Sequenz innerhalb des Promotors sowie den Einfluss von c/EBP α auf das Fusionsprotein AML1-ETO. Bei der Auswertung der Messungen wurden die Aktivitäten jeweils auf den Leervektor pGL3-Basic bezogen.

Um die Aktivität des Plakoglobin Promotors auszuschalten, wurden verschiedene Mutanten hergestellt. Die Mutationen befinden sich innerhalb der 10 bp Region die durch das Fusionsprotein AML1-ETO beeinflusst wird und sind in rot dargestellt. Die CCAAT Sequenz oder die entsprechend mutierte Sequenz an der Stelle ist in Fett dargestellt.

Bei der Deletion 6 handelt es sich um eine Deletion der Region vor der CCAAT Sequenz. Dies könnte Aufschluss über die Wichtigkeit der entsprechenden Region durch die Regulation mit dem Fusionsprotein AML1-ETO geben. Bei der Mutation 5 besteht noch immer die Möglichkeit, dass eine mutierte Sequenz für die Regulation ebenfalls genutzt werden kann.

Folgende Primer für die Mutation wurden hergestellt.

Original Fragment ccggggccaatggcaagc
 Mutation 1 (mut1) ccggggc**TT**atggcaagc
 Mutation 2 (mut2) ccggg**TTT**aatggcaagc
 Mutation 3 (mut3) ccggggcc**TTA**ggcaagc
 Mutation 4 (mut4) ccggggccaat**AAA**aagc
 Mutation 5 (mut5) cc**TTT**gccaatggcaagcgg
 Deletion 6 (del6) **ccccaat**ggcaagcgg

Tabelle 17: Mittelwerte der Messungen der unterschiedlichen Mutationen in dem Promotorfragment -197/+11

	-197/+11	mut1	mut2	mut3	mut4	mut5	del6
pGL3-Basic	1	1	1	1	1	1	1
-197/+11	13,70	11,83	12,56	13,83	10,37	10,78	12,82
+ AML1-ETO	63,35	54,40	57,07	53,50	69,93	50,55	78,85

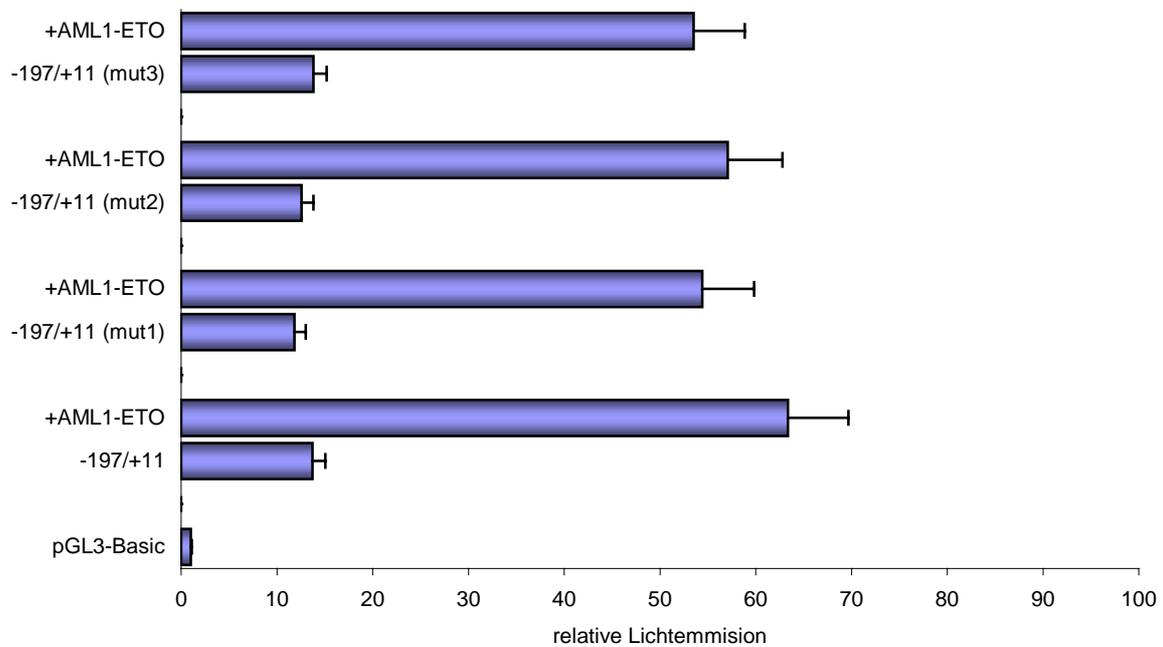


Abbildung 29: Aktivität der Promotormutationen 1, 2 und 3 mit und ohne AML1-ETO

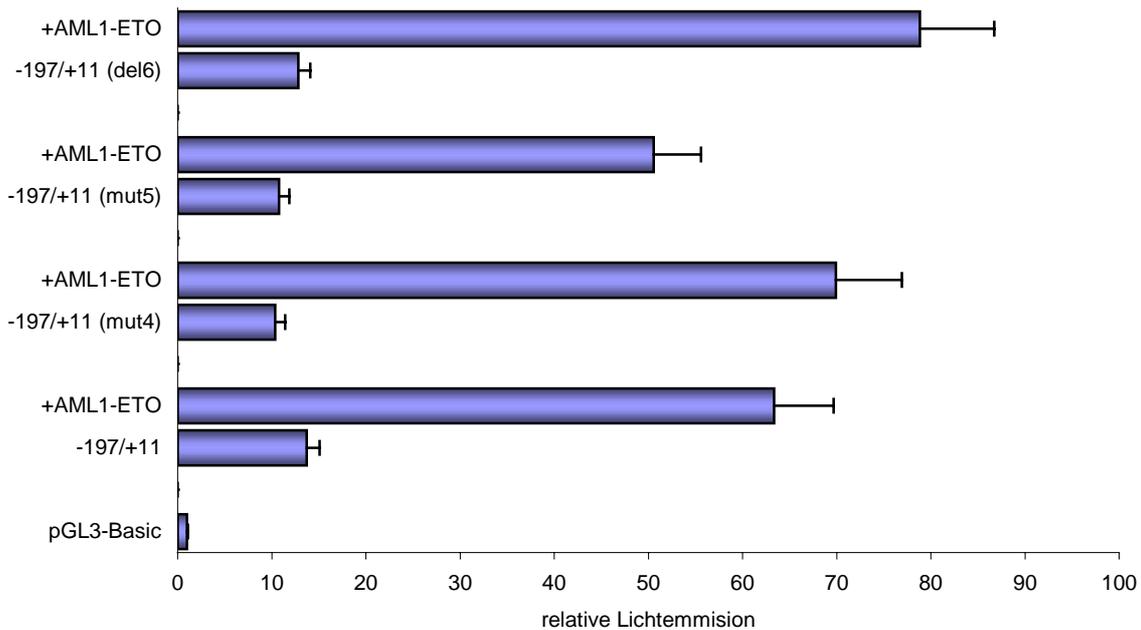


Abbildung 30: Aktivität der Promotormutation 4, 5 und der Deletion 6 mit und ohne AML1-ETO in einem Vergleich zu dem nicht veränderten Promotorfragment.

Die Diagramme zeigen, dass die untersuchten Mutationen in der Promotorregion weiterhin durch das Fusionsprotein AML1-ETO reguliert werden.

Der Promotor von Plakoglobin wurde verschiedentlich auch auf eine mögliche Regulation durch die Transkriptionsfaktoren selbst (PML, AML1b oder PLFZ) untersucht. Eine Regulation dieser Transkriptionsfaktoren konnte durch die entsprechenden Ergebnisse ausgeschlossen werden (hier nicht dargestellt).

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen zum Plakoglobin Promotor wurde ein kurzes 85 bp Fragment aus dem Plakoglobin Promotor vor den TK Promotor der in den pGL3-Basic Vektor kloniert wurde eingefügt. Das kurze Promotorfragment umfasst den Bereich des Plakoglobin Promotors von -199 bis -114 (inklusive der regulierenden 10 bp Region). Diese Klonierung wurde durchgeführt, um festzustellen ob die Regulation durch das Fusionsprotein AML1-ETO innerhalb dieses Bereiches liegt.

Tabelle 18: Luziferase Assay des Thymidin-Kinase Promotors (TK) in dem pGL3-Basic Vektor zusammen mit dem Plakoglobin Promotor Fragment -199/-114. Die Messungen wurden mit und ohne dem Fusionsprotein AML1-ETO durchgeführt.

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Mittelwert	Standardabweichung
pGL3-Basic	1	1	1	1	0
pGL3-Basic-TK	35,78	29,09	25,23	30,03	5,34
+AML1-ETO	89,77	152,44	91,26	111,16	35,76
-199/+114-TK	27,79	17,12	26,18	23,70	5,75
+AML1-ETO	98,77	157,61	154,59	136,99	33,13

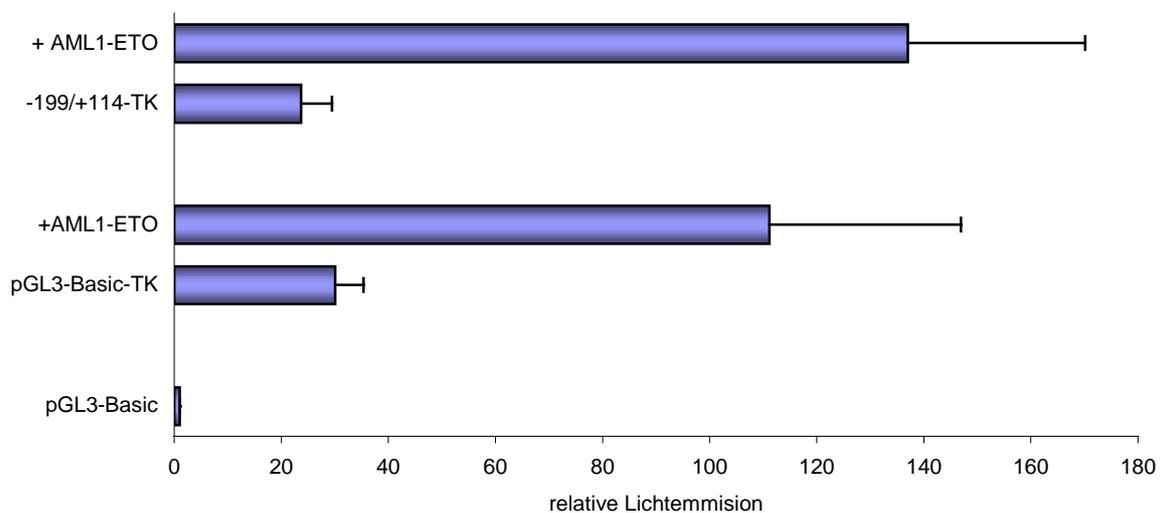


Abbildung 31: Regulation des kurzen Promotorbereiches durch AML1-ETO

Für einen Vergleich der Ergebnisse wurde der pGL3-Basic Leevektor eins gesetzt und die anderen Ergebnisse darauf bezogen.

Bei dem Versuch wurde festgestellt, dass das Fusionsprotein AML1-ETO regulierend auf den Thymidin-Kinase Promotor (TK) einwirkt (siehe Abbildung 31). Die Regulation durch das Fusionsprotein AML1-ETO ist bei dem Promotorfragment -199/-114/TK zwar etwas stärker, aber die Regulation des Kontrollvektor pGL3-Basic-TK durch das Fusionsprotein ist zu groß um eine vernünftige Aussage zu dem 85 bp großen Plakoglobin Promotorfragment treffen zu können.

Um dem Problem der ungewöhnlichen Regulation (bedingt durch die Aktivität der Mutanten) des Fusionsproteins AML1-ETO näher zu kommen, wurde als nächstes die Frage gestellt, welche Domänen in dem Fusionsprotein für die Regulation verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Mutanten des Fusionsproteins AML1-ETO zusammen mit dem Plakoglobin Promotorfragment -197/+11 verwendet (Scott Hiebert, Nashville, USA). Die Transfektion wurde in Hela Zellen durchgeführt und viermal wiederholt.

Tabelle 19: Ergebnisse der Luziferase Assays mit den AML1-ETO Mutanten und dem Plakoglobin Promotor in Hela Zellen. Bei der Berechnung der Regulation wurden die Werte auf den Leervektor pCMV5 bezogen.

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Mittelwert	Standardabweichung
pCMV5	1	1	1	1	1,0	0,0
AML1-ETO	13,4	2,117	8,2	3,76	8,5	2,8
delta NHR3	14,4	1,396	4,8	3,65	7,6	3,5
delta 530-590	17	2,354	7,25	2,88	9,0	4,3
delta HHR	10,75	1,137	4,2	2,67	5,9	2,5
delta HHR/ZF	5,25	0,586	2,2	1,38	2,9	1,2
delta TAF	13,3	1,011	4,5	1,7	6,5	3,6
delta 350-428	1,4	0,2	0,68	0,36	0,8	0,3
delta ZF	7,25	0,889	4,2	1,44	4,3	1,7
1-469	3,8	0,314	1,2	1,04	2,0	0,9
ETO	1,1	0,288	0,64	0,78	0,8	0,1

Tabelle 20: Die Ergebnisse wurden alle auf die Regulation des kompletten Fusionsproteins bezogen. Die Regulation des Fusionsproteins AML1-ETO wurde mit 100 % festgelegt.

	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4	Mittelwert	Standardabweichung
AML1-ETO	100	100	100	100	100	0
delta NHR3	107,5	65,9	58,5	97,1	82,3	11,8
delta 530-590	126,9	111,2	88,4	76,6	100,8	11,3
delta HHR	80,2	53,7	51,2	71,0	64,0	7,0
delta HHR/ZF	39,2	27,7	26,8	36,7	32,6	3,1
delta TAF	99,3	47,8	54,9	45,2	61,8	12,7
delta 350-428	10,4	9,4	8,3	9,6	9,4	0,4
delta ZF	54,1	42,0	51,2	38,3	46,4	3,7
1-469	28,4	14,8	14,6	27,7	21,4	3,8
ETO	8,2	13,6	7,8	20,7	12,6	3,0

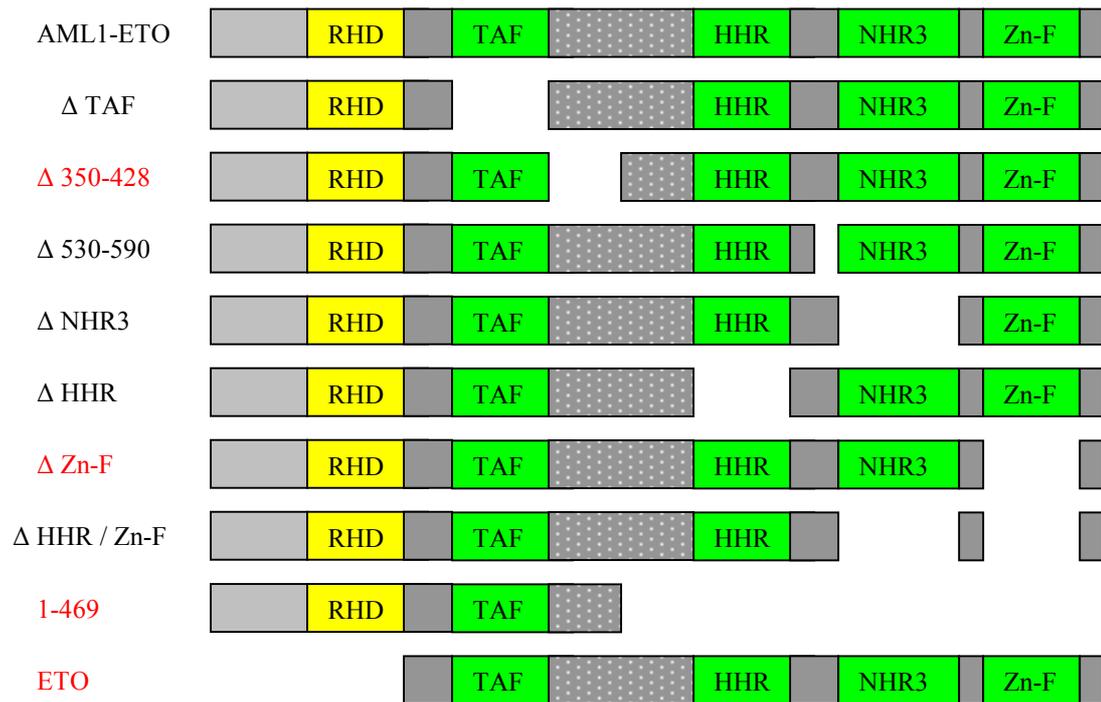


Abbildung 32: Darstellung der AML1-ETO Mutanten mit den jeweils betroffenen Regionen. Zur Kontrolle wurde ebenfalls der Transkriptionsfaktor ETO sowie das nicht mutierte Fusionsprotein verwendet.

RHD = runt homology domain; TAF = transcription-activation factor; HHR = hydrophobic heptad repeat; NHR3 = nervy homology region 3; Zn-F = zinc finger motif

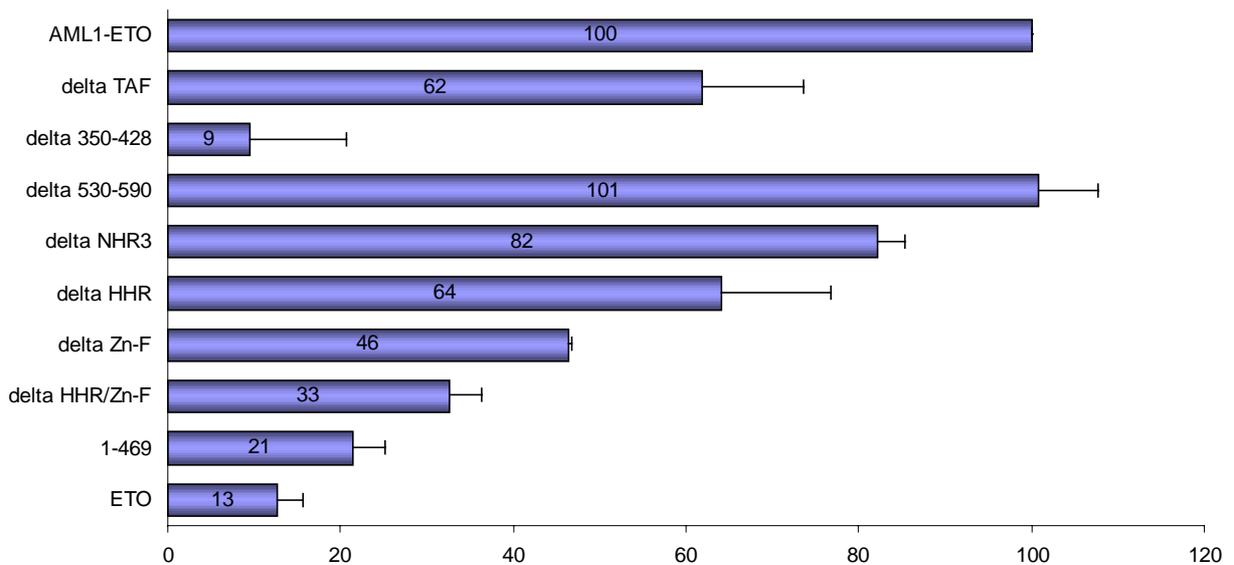


Abbildung 33: Luziferase Assay der AML1-ETO Mutanten mit dem Plakoglobin Promotor -197/+11. Die Ergebnisse der Regulation wurden entsprechend gerundet.

Bei der Auswertung wurde die Regulation durch das nicht mutierte Fusionsprotein AML1-ETO auf 100 gesetzt um die Unterschiede deutlich zu erkennen. Die in rot (Abbildung 32) hervorgehobenen Bereiche Δ 350-428, Δ Zn-F sowie der Bereich 1-469 zeigen zusammen mit dem Plakoglobin Promotor die geringste Regulation durch die entsprechende Mutante. Der geringe Wert für den Transkriptionsfaktor ETO von 13 zeigt, dass der Einfluss von ETO selbst auf die Regulation gering ist. Dies begründet sich daher, dass ETO als Transkriptionsfaktor nicht selbst an die DNA bindet, zeigt aber auch, dass eine Regulation über die Bindung an einen anderen Transkriptionsfaktor nicht entsteht. Es ist also die DNA Bindungs-Domäne des AML1b Anteils in der RHD notwendig um eine Regulation auszuüben. Ebenfalls zeigen die Ergebnisse, dass die C-Terminale Bereich des ETO Anteils eine wichtige Funktion in der Regulation übernimmt. Der Bereich 350-428 sowie die Zn-F Domäne und zu einem geringeren Anteil auch die HHR Region.

4. Diskussion

Die Micro-Array Chipanalyse ist eine effektive Technik, um die genomweite Genexpression zu untersuchen (Kurian, Watson et al. 1999). Mit dieser Technik kann das Expressionsprofil sehr vieler Gene unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Hier wurden humane Gene unter dem Einfluss der Fusionsproteine AML1-ETO, PML-RAR α und PLZF-RAR α untersucht. Die Ergebnisse der Chipanalyse zeigten in der statistischen Auswertung eine Vielzahl regulierter Gene. Nach einer Auswahl der Gene hinsichtlich Funktion (siehe Tabelle 6, Seite 53 und 54) und dem Einfluss der Fusionsproteine auf die Expression, wurde die Regulation der unterschiedlichen Gene durch die RT-PCR (TaqMan) verifiziert (Schmittgen, Zakrajsek et al. 2000). Hierzu wurde für die TaqMan Analyse zunächst Primer erstellt, wobei darauf geachtet wurde möglichst einen der Primer (oder die SONDENSEQUENZ, siehe weiter unten) über eine Exon-Exon Grenze zu legen, um so einer möglichen Amplifizierung chromosomaler DNA zu vorbeugen. Für die erste Untersuchung der Gene durch die RT-PCR (TaqMan) wurde SybrGreen eingesetzt und als Referenz GapDH (Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase) oder TBP (Tata-Binding-Protein) verwendet (Schmittgen and Zakrajsek 2000). Die Untersuchungen wurden in zunächst mit SybrGreen durchgeführt, wodurch ein Teil der Gene in ihrer Regulation bestätigt werden konnte. Insgesamt wurden 60 Gene untersucht von denen 52 in der Tabelle 4a und b aufgeführt sind. Bei den untersuchten Genen zeigte sich, dass von den 52 Genen 38 Gene in ihrer Expression durch die Fusionsproteine reprimiert werden und 14 Gene eine höhere Expression. Von den aufgeführten Genen wurden vier ausgesucht und für diese Gene eine entsprechende Sonde konstruiert, um die Untersuchungen in einer weiteren RT-PCR zu verifizieren. Bei diesen Genen handelt es sich um γ -Catenin (Plakoglobin; Z68228), ID2 (Inhibitor of differentiation 2; M97796), PAF (platelet activating factor acetylhydrolase IB gamma-subunit; D63391), MEF (myeloid elf-1 like factor; U32645). In einer weiteren Real-Time RT-PCR konnte die Regulation dreier Gene durch die Fusionsproteine bestätigt werden. Eine Ausnahme bildete hier das PAF Gen dessen Messergebnisse nicht das Ergebnis der Chip Analyse bestätigte. Aus diesem Grund wurde das PAF Gen für die weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Von den drei übrig gebliebenen Genen zeigen die Ergebnisse der Chip Analyse und der RT-PCR, dass das ID2 und MEF Gen durch die Fusionsproteine in ihrer Expression reprimiert werden. Das Plakoglobin Gen (γ -Catenin) wird hingegen durch alle drei Fusionsproteine in seiner Expression induziert.

4.1 Die Regulation des ID2 Gens durch AML Fusionsproteine

Die Basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren nehmen eine zentrale Rolle in der Proliferation und Differenzierung ein ((Jan and Jan 1993) (Weintraub 1993) (Hassan and Bellen 2000). Namengebend für diese Familie ist die HLH Region, die eine Größe von ungefähr 60 Aminosäuren einschließlich der DNA bindenden Domäne umfasst, an die sich zwei α -Helices anschließen die wiederum von einer variablen Loop Region (HLH) getrennt werden (Ferre-D'Amare, Prendergast et al. 1993). Die HLH Region ist verantwortlich für die Dimerisierung und erlaubt die Bildung von Homodimeren oder Heterodimeren Komplexen zwischen den verschiedenen Familienmitgliedern. Die beiden Basic Regionen binden nach der Dimerisierung an eine spezifische hexanukleotid Sequenz der DNA (Ohsako, Hyer et al. 1994) (Murre, McCaw et al. 1989). Nach der erstmaligen Beschreibung des bHLH Motives 1989 in der Maus (Murre, McCaw et al. 1989) wurde eine Klassifizierung der bHLH Proteine durchgeführt. Auf einer Basis von 242 Aminosäuresequenzen von bHLH Proteinen wurden die Proteine in vier Gruppen A-D eingeteilt (Atchley and Fitch 1997). Diese Einteilung erfolgte auf der Grundlage der DNA Bindedomäne (E-Box), der Aminosäuresequenz in anderen Komponenten des Motives sowie dem Vorhandensein einer Leucin Zipper Domäne (LZ). Die Leucin Zipper Domäne ist charakterisiert durch eine aus sieben Leucin bestehende Region, C-Terminal direkt im Anschluss an der bHLH Region gelegen. Gruppe A und B Proteine binden an hexamere Sequenzen der E-Box CAC/gCTG (Gruppe A) und CACGTG / CATGTTG (Gruppe B) (Murre, McCaw et al. 1989) (Van Doren, Ellis et al. 1991); (Dang, Dolde et al. 1992).

Die Gruppe A schließt verschiedene Gewebespezifische bHLH Proteine ein wie MyoD, Twist u.a.(Ledent and Vervoort 2001) (Hassan and Bellen 2000) sowie ubiquitär exprimierte Proteine wie E12, E47 (Spleißprodukt des E2F Transkriptionsfaktor) und E2A. In vielen Fällen bilden die Gruppe A Proteine inaktive Homodimere und benötigen zur Bildung eines aktiven Heterodimers die Anwesenheit eines weiteren Partners (z.B. E12/Daughterless) (Cabrera and Alonso 1991) (Lassar, Davis et al. 1991) (Van Doren, Powell et al. 1992).

Zur Gruppe B gehören eine große Anzahl funktionell nicht verwandter Proteine (z.B. Myc, Max, USF usw.), die in unterschiedliche Prozesse und Entwicklungsstadien der Zelle involviert sind. Einige Mitglieder der Gruppe B besitzen zusätzlich die Leucin Zipper Region, die wie die HLH Domäne an der Dimerisierung beteiligt ist. Die Leucin Zipper Proteine binden an das DNA Motiv CACGTG(Atchley and Fitch 1997). Verschiedene Proteine der Gruppe B, die nahe verwandt sind zu den Drosophila Hairy und Enhancer of Split (HER

Proteine) (Fisher and Caudy 1998) sind charakterisiert durch die Eigenschaft an entscheidenden Positionen der Basic Domäne ein Prolin anstatt ein Arginin zu besitzen. Studien haben gezeigt, dass Proteine der Gruppe B vorzugsweise an eine Sequenz binden, die als N-Box bekannt ist (CACGC/aG). Die HER Proteine besitzen eine weitere WRPW/Y Domäne, ein vier Aminosäure Motiv das eine Interaktion mit Groucho Repressor Proteinen erlaubt (z.B. hairy) (Fisher and Caudy 1998). Eine Studie hat gezeigt, dass Groucho Proteine mit Histone Deacetylasen (HDAC) interagieren können und so als Repressor fungieren (Chen, Fernandez et al. 1999).

Die Gruppe C Proteine beinhaltet Proteine die bekannt sind unter dem Namen bHLH-PAS, deren charakteristisches Merkmal die PAS Domäne ist. Namen gebend für die PAS Domäne waren die ersten drei Proteine die dieses Motiv aufwiesen. Das Drosophila Period (PER), das humane ARNT (human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) und das Drosophila Single-minded (SIM) (Ledent and Vervoort 2001). Direkt an die N-terminal gelegene HLH Domäne schließt sich die PAS Domäne übergangslos an. Die PAS Domäne besteht aus zwei konservierten Bereichen die durch eine weniger konservierte Region getrennt sind, hat eine Länge von 260 bis 310 Aminosäuren und erlaubt die Homodimerisierung zwischen PAS Proteinen untereinander (Crews 1998). Die Funktion der PAS Domäne ist allerdings weitreichender und in der Regel bilden sich Heterodimere. Sie kann kleine Moleküle wie Dioxin binden (Toxin Stoffwechsel), und auch mit nicht PAS Domänen interagieren. Verschiedene Funktionen wie die Kontrolle Entwicklungsmäßiger und physiologischer Ereignisse, Neurogenese und circadiane Kontrolle werden ihr zugeschrieben. Proteine mit einer bHLH-PAS Region binden an A/gCGTG Sequenzen.

Proteine der Gruppe D besitzen keine Basic Region und damit nicht die Möglichkeit an DNA zu binden. Mitglieder dieser Gruppe D wie EMC (Extramacrochaete) oder ID (Inhibitor of differentiation) fungieren daher als Antagonisten speziell der Gruppe A und B Proteine (Van Doren, Ellis et al. 1991).

Eine Gruppe von HLH Proteinen mit einer weiteren Domäne die sowohl in der Dimerisierung als auch an der Bindung an die DNA beteiligt ist, wurde als COE Familie (Collier, Olf-1, /EBF) bezeichnet. Die HLH Sequenzen dieser Gruppe unterscheiden sich sehr von den bHLH Motiven anderer Proteine.

Die Proteine der Gruppe A dimerisieren in der Regel mit den Gruppe B Proteinen zur Bildung eines Heterodimers. Während die Proteine der Gruppe D sowohl mit Gruppe A als auch mit Gruppe B Proteinen Heterodimere bilden und auf diese Weise die Transkriptionelle Aktivität kontrollieren. Heterodimere Proteine der Gruppe A und B können an die DNA binden, da

beide Proteine N-terminal der HLH Domäne eine Basic Region besitzen und für eine effektive Bindung an die DNA eine Bindedomäne ausbilden die als E-Box bekannt ist (Chaudhary, Mosher et al. 2000). Heterodimere die mit Proteinen der Gruppe D gebildet werden führt nicht zu einer DNA Bindung, da die Gruppe D Proteine die Basic region die für die DNA Bindung notwendig ist nicht besitzen. Daher handelt es sich bei den Gruppe D Proteinen nicht um Transkriptionsfaktoren, sondern um Transkriptionelle Regulatoren. Die Funktion der gebildeten Heterodimere mit Gruppe D Proteinen kann daher sehr unterschiedlich sein.

Andere Klassifikationen teilen die oben beschriebenen Gruppen in sieben Klassen ein, die einerseits auf eine Zellverteilung der Proteine wie auch auf die Möglichkeiten der Dimerisierung und der DNA-Bindung Bezug nehmen (Massari and Murre 2000). In dieser Klassifizierung werden zum Beispiel die Gruppe B Proteine mit einem Prolin (anstelle des Arginin) in der Basic Region in eine eigene Klasse VI gestellt. Die HLH Proteine die keine Basic Region besitzen wie die ID Proteine werden als negative Regulatoren der Klassen I und II in die Klasse V gestellt.

Die Mitglieder der ID Protein Familie (Inhibitor of differentiation / DNA binding) besitzen keine Basic Domäne und können demzufolge nicht selbst an die DNA binden. Aufgrund dieser Eigenschaft werden die ID Proteine zur Gruppe D (Klasse V) der bHLH Proteine gerechnet. Von den ID Proteinen sind bislang vier Mitglieder (ID1, ID2, ID3 und ID4) beschrieben worden, die alle eine homologe HLH Domäne besitzen. Die ID Protein Familie bilden mit Gruppe A und B Proteinen Heterodimere und verhindert so die DNA Bindung des entsprechenden Transkriptionsfaktors, weshalb die ID Proteine daher auch als dominant negative Regulatoren unterschiedlicher Stoffwechselwege bezeichnet werden und der entsprechende Effekt sehr unterschiedlich sein kann (Benezra, Davis et al. 1990; Benezra, Davis et al. 1990; Sun, Copeland et al. 1991; Langlands, Yin et al. 1997). ID Proteine werden generell als Inhibitoren der Differenzierung bezeichnet. So ist z.B. die Expression der einzelnen ID Proteine in einer Neuroblastoma Zelllinie sehr verschieden, und während der Differenzierung der Zellen sind die ID Proteine reprimiert (Jogi, Persson et al. 2002). ID Proteine spielen ebenfalls eine Rolle in der Entstehung des Nervengewebes. Die Expression der verschiedenen ID Proteine weist auf eine sehr spezialisierte Funktion der unterschiedlichen ID Proteine hin. So zeigte eine Überexpression von ID2 in Hühnerembryos eine frühzeitige Entwicklung von Nervengewebe (Martinsen and Bronner-Fraser 1998). Eine Zuordnung der Funktion der ID Proteine wurde über die Herstellung verschiedener Knock-out

Mäuse versucht. Während die ID1 Knock-out Mäuse keine Abnormalitäten zeigen, sind in ID2 Knock-out Mäusen keine Lymphknoten vorhanden und die Entwicklung natürlicher Killerzellen ist stark gestört (Yan, Young et al. 1997; Yokota, Mansouri et al. 1999). In ID3 Knock-out Mäusen haben eine gestörte Entwicklung der T-Zellen, und ein Doppel-Knock-out der ID1/ID3 Gene sind in Mäusen sind letal (Lyden, Young et al. 1999). ID1 und ID3 nehmen eine Schlüsselrolle in der Angiogenese, der Neurogenese und der Gefäßentwicklung ein (Lyden, Young et al. 1999). Ebenso wie ID1 und ID3 ist ID2 involviert in der Regulation des Zellwachstums wie in der G1 Phase des Zellzyklus (Barone, Pepperkok et al. 1994; Peverali, Ramqvist et al. 1994). ID2 scheint allerdings im Gegensatz zu den anderen ID Proteinen eine wichtige Rolle während der Differenzierung myeloischer Zellen zu besitzen. ID2 mRNA ist in reifen Myeloblasten konstitutiv exprimiert und die Expression nimmt mit der weiteren Differenzierung der Zellen zu. Hier scheint ein HLH Proteinkomplex der normalerweise die Differenzierung reprimiert durch ID2 inhibiert zu werden (Ishiguro, Spirin et al. 1996). ID4 ist in adulten Mäusen hauptsächlich exprimiert im Testis, Gehirn und den Nieren und inhibiert als dominant-negativer Regulator zum Beispiel die DNA Bindung von E47 Homodimeren und E47/MyoD Heterodimeren (Riechmann, van Cruchten et al. 1994).

Wie die ID Proteine selbst reguliert werden, ist bislang unbekannt. Es wurde allerdings gezeigt, dass eine Zellzyklus regulierte Phosphorylierung von ID2 und ID3 durch cdk2 die Fähigkeit zur Dimerbildung mit Proteinen der Gruppen A und B inhibiert (Deed, Hara et al. 1997; Hara, Hall et al. 1997). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Expression von ID1 durch STAT5 und c/EBP β reguliert wird (Xu, Nie et al. 2003). ID2 wird eine direkte Bindung zu pRb (Retinoblastoma Proteinprodukt), p107 und p130 zugeschrieben, das zu Aktivierung von S-Phase Proteinen wie E2F führt (Sikder, Devlin et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ID2 durch AML-Fusionsproteine reguliert wird. Dieses Ergebnis konnte zum einen in der Chipanalyse, zum anderen aber auch im Westernblot gezeigt werden (siehe S. 64). Der Einfluss der Fusionsproteine auf ID2 konnte auch in Patientenproben nachgewiesen werden. In sechs Patientenproben war das Fusionsprotein AML1-ETO, in drei das Fusionsprotein PML-RAR α nachgewiesen worden. Die restliche 57 Patienten zeigten keine nachweisbare Translokation der entsprechenden Fusionsproteine (siehe S. 56). Die Ergebnisse der Real-Time RT-PCR Untersuchung zeigten, dass in den Patientenproben die ein Fusionsprotein exprimierten (AML1-ETO oder PML-RAR α), das ID2 Gen deutlich reprimiert war. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, inhibieren die Fusionsproteine die Differenzierung myeloischer Zellen durch die Rekrutierung

von Histonedecetylasen (HDAC), was zu einer Reprimierung der entsprechenden Zielgene auf DNA Ebene führt (Grunstein 1997).

Die Klonierung des ID2 Promotors und die Versuche zur Regulation des Promotors durch die Fusionsproteine in einem Luziferase Assay gaben keinen Hinweis darauf, dass die entsprechende Promotorsequenz durch die Fusionsproteine reguliert wird. Auch eine entsprechende AML1 Bindestelle in dem ID2 Promotor konnte nicht gefunden werden. Die mRNA des ID2 Gens hat eine Halbwertszeit von etwa einer Stunde (Ishiguro, Spirin et al. 1996) was zu der Annahme führt, dass hier möglicherweise eine Stabilisierung auf mRNA Ebene vorliegt. Eine weitere Möglichkeit wäre ein direkter stabilisierender Einfluss der Fusionsproteine auf das ID2 Proteins selbst, was eine längere Verweildauer im Zellkern und Aktivität des Proteins zur Folge hätte. In diesem Fall wäre allerdings kein Effekt bei der Real-Time RT-PCR zu beobachten. Eine Untersuchung der Promotorsequenz auf Bindestellen bestimmter Transkriptionsfaktoren führte durchaus zum Erfolg. Hier wurden speziell Bindestellen für c/EBP, NFY, NF1, MZF1 sowie verschiedene GATA Transkriptionsfaktoren gefunden, die für eine Regulation möglicherweise Frage kommen. Weiterhin wurden drei potentielle PU1 Bindestellen innerhalb der Promotorsequenz lokalisiert. Ob eine Regulation über diesen speziellen Transkriptionsfaktor erfolgt wurde nicht überprüft. Dies könnte geschehen durch eine Punktmutation an den entsprechenden Stellen. Die Promotoraktivität könnte anschließend durch Klonierung einer zusätzlichen TATA Sequenz innerhalb des Promotors zurückgewonnen werden. Das Kolonie Assay mit 32D Zellen, die mit dem ID2 Gen transfiziert wurden, zeigte in der Auswertung eine geringere Kolonienzahl. Wurden die 32D Zellen außer mit dem ID2 auch zusätzlich mit dem Fusionsprotein AML1-ETO transfiziert, so konnte in allen Proben wieder eine erhöhte Koloniebildung registriert werden. Damit konnte auch hier gezeigt werden, dass das Fusionsprotein AML1-ETO ID2 inhibiert und dies wieder zu einer normalen Koloniebildung führt.

4.2 Das MEF Gen und seine Regulation durch AML-Fusionsproteine

Transkriptionsfaktoren sind in Familien gruppiert, die einerseits durch die DNA binde Domäne charakterisiert sind, andererseits aber auch durch weitere wichtige funktionelle Domänen (Greenall, Willingham et al. 2001). Die ETS Familie der Transkriptionsfaktoren

nimmt eine wichtige Rolle in verschiedenen Stadien und Funktionen der Zelle ein. Diese reichen vom Zellwachstum, der Proliferation, der Entwicklung bis hin zur Differenzierung und Apoptose der Zelle (Sementchenko and Watson 2000). Die ETS Familie ist charakterisiert durch eine aus 85 Aminosäuren bestehende winged helix-turn-helix DNA bindende Domäne und binden an eine spezifische Purin-reiche DNA Region mit einem GGAA/T Motiv (Crepieux, Coll et al. 1994). Basierend auf Ähnlichkeiten und der Position der ETS Domäne wurden die Mitglieder der ETS Familie in verschiedene Subfamilien eingeteilt, die die Expression einer Anzahl viraler und zellulärer Gene regulieren (Mao, Frank et al. 1999). Proteine mit einer ETS Domäne können unterschiedliche Funktionen einnehmen. So können sie einerseits transkriptionelle Aktivatoren zum anderen aber auch Repressoren sein, deren Aktivität durch Signaltransduktion Wege einschließlich des MAP Kinase Signalweges reguliert wird (Sharrocks, Brown et al. 1997). Als Beispiel kann hier TCF (ternary complex factor) genannt werden, der durch den MAP Kinase Pathway aktiviert wird und mit SRF (serum response factor) und dem c-fos Protein SRE einen ternären Komplex bildet (Ling, Lakey et al. 1997). ETS Proteine können einerseits als einzelne Transkriptionsfaktoren Zielgene aktivieren, andererseits bilden sie aber gewöhnlich regulatorische Komplexe mit anderen Transkriptionsfaktoren (Bruhn, Munnerlyn et al. 1997). Mitglieder der ETS Familie sind häufig Ziel chromosomaler Translokationen unterschiedlicher Krebsarten und bilden Fusionsproteine wie TEL-AML1, TEL-ABL, TEL-PDGFB, EWS-FLI-1, FLI-EWS, EWS-ERG, ERG-EWS, EWS-ETV1, und ETV1-EWS (Delattre, Zucman et al. 1992; Golub, Barker et al. 1994; Golub, Barker et al. 1995; Papadopoulos, Ridge et al. 1995). Ein wichtiger Transkriptionsfaktor der ETS Familie ist PU1, der eine besondere Stellung innerhalb der Transkriptionsfaktoren einnimmt. Viele myeloische Promotoren besitzen eine funktionelle PU1 Bindestelle (GAGGAAG) aber oft keine TATA Box oder definierte Initiatorsequenz weil PU1 das TBP (TATA-binding protein) binden und so den entsprechenden Promotor aktivieren kann (Hagemeier, Bannister et al. 1993; Tenen, Hromas et al. 1997). Interessanterweise kann PU1 durch das Fusionsprotein AML1-ETO inaktiviert werden, was einen kompletten Block in der myeloischen Differenzierung hervorruft (Vangala, Heiss-Neumann et al. 2003).

Die E74/ELF Subfamilie der ETS Transkriptionsfaktoren beinhaltet das Drosophila E74 Protein sowie das Humane ELF1, NERF und auch das MEF (myeloid ELF1 like factor) Protein. MEF ist in vielen lymphatischen und myeloischen Zelllinien exprimiert und hat einen starken transkriptionell aktivierenden Effekt auf entsprechende Zielgene (Miyazaki, Sun et al.

1996). Das MEF-Gen (myeloid elf 1 like factor) ist auf dem X Chromosom lokalisiert, umfasst eine Größe von 1992 bp und das Protein besteht aus 663 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 70,6 kDa.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass MEF ein Zielgen verschiedener Fusionsproteine bei der AML ist, wobei der Nachweis sowohl in Zelllinien als auch in Patientenproben geführt werden konnte.

Die Auswirkungen der Expression von Fusionsproteinen, und hier speziell AML1-ETO sowie PML-RAR α , auf die Expression des MEF Gens wurde in Patientenproben untersucht. Das MEF an AML1-ETO innerhalb der RHD (runt homology domain) bindet, ist bereits 1999 in der Kasumi- und COS7 Zelllinie gezeigt worden (Mao, Frank et al. 1999). Es ist allerdings nicht gezeigt worden, dass AML1-ETO die Expression des MEF Gens reprimiert. Die Chipanalyse und die anschließenden Untersuchungen in der U937 Zelllinie mit Expression der Fusionsproteine AML1-ETO, PML-RAR α sowie PLZF-RAR α zeigten eine geringere Expression des MEF Gens in den Zellen, die eines der Fusionsproteine exprimieren. Die Ergebnisse der Chipanalyse wurden durch Real-Time RT-PCR bestätigt. Ebenso konnte in Patientenproben die Expression des MEF wie die bei dem ID2 Gen durch real Time RT-PCR in den gleichen Proben gemessen werden (siehe S. 56). Die Ergebnisse der Real-Time RT-PCR Untersuchung zeigten das in den Patientenproben die ein Fusionsprotein exprimierten (AML1-ETO oder PML-RAR α) das MEF Gen reprimiert war. Das durchgeführte Kolonie Assay zeigte keine Veränderungen in der Koloniebildung durch das zusätzlich transfizierte MEF Gen in dem pCDNA3.1 Expressionsvektor.

4.3 Regulation des Plakoglobins durch die Fusionsproteine der AML

Die wnt Gene kodieren eine große Familie von Cystein reichen Proteinen, die zusammen mit der BMP-, Hedgehog- und der FGF-Familie eine Schlüsselrolle als interzelluläres Signalmolekül in der Entwicklung und der Embryogenese einnehmen. Die Bezeichnung der wnt Gene ist durch eine hohe Homologie zu den entsprechenden Maus Gen wnt1 (ursprünglich als int1 bezeichnet)(Nusse and Varmus 1982) und dem Drosophila Gen wingless (wg) entstanden (Cabrera, Alonso et al. 1987; Rijsewijk, Schuermann et al. 1987). Die wnt Gene kodieren Proteine die gewöhnlich 300 bis 400 Aminosäuren lang sind und zu

denen Homologien in vielen anderen Organismen von den Säugern bis zu den Nematoden und Insekten gefunden wurden (Cadigan and Nusse 1997).

Die Signalkaskade des wnt Signalweges beginnt mit der Bindung eines wnt Proteins an dem N-Terminus des Frizzled Rezeptors an der Zellmembran. Der Frizzled Rezeptor ist ein sieben Helix Transmembranprotein dessen Aktivierung zur Phosphorylierung des Dishevelled Proteins in der Zelle führt. Dishevelled ist definiert als positiver Mediator des wnt Signalweges downstream des Frizzled Rezeptors und upstream des β -catenins, welches eine doppelte Rolle übernommen hat. Zum einen ist dies die Signalübertragung innerhalb des wnt Signalweges, die zur Stabilisierung des β -catenins führt, und zum anderen eine Funktion bei der Signalübertragung zur Aktivierung der jun-Kinase (Li, Yuan et al. 1999; Ben-Ze'ev, Shtutman et al. 2000; Vogt 2001). Die Aktivierung des Dishevelled führt über eine Komplexbildung mit dem in Vertebraten vorhandenen Frat-1 Protein zur Inaktivierung der Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β). Unterstützt wird die Komplexbildung durch die Casein Kinase 1 ϵ (CKI) (Hino, Michiue et al. 2003). Die GSK3 β ist eine Serin-Threonin-Kinase, die unterschiedliche Proteine innerhalb des wnt Signalweges bindet und phosphoryliert, so zum Beispiel auch das β -catenin, und ist das humane homolog zum Drosophila Zeste-white 3 Protein (Li, Yuan et al. 1999; Polakis 2000). Ein weiteres wichtiges zentrales Molekül innerhalb des wnt Signalweges ist das adenomatous polyposis coli Protein (APC). APC bildet mit β -catenin einen Komplex, wodurch es über die Phosphorylierung durch GSK3 β und anschließend durch den Ubiquitin Proteasom Pathway abgebaut wird (Wodarz and Nusse 1998). Axin stellt eine weitere Komponente des wnt Signalweges dar. Ursprünglich wurde Axin als Inhibitor des wnt Signalwege in Xenopus Embryos identifiziert, sowie dessen direkte Bindung an APC, β -catenin, GSK3 β sowie an Dishevelled (Polakis 2000). β -catenin hat in der Zelle unterschiedliche Funktionen. Zum einen als Transkriptionsfaktor im Zellkern, zum anderen spielt es eine Rolle in der Bildung der Zell-Zell Kontakte (adherens junctions) durch die Bindung an E-cadherin.

Die Aktivierung der Signalkaskade durch Wnt führt über die Inaktivierung des GSK3 β zu frei in der Zelle vorliegendem nicht phosphoryliertem β -catenin. β -catenin kann nun über einen bislang nicht geklärten Mechanismus in den Zellkern eindringen und über die Bindung an Transkriptionsfaktoren (TCF, LEF) die Expression von Zielgenen induzieren (Willert and Nusse 1998; Peifer and Polakis 2000).

Die Protein Phosphatase 2A (PPA2) ist eine Serin-Threonin Phosphatase die aus drei verschiedenen Untereinheiten besteht. Einer Struktur gebenden, einer Regulatorischen- und einer Katalytischen Untereinheit die an die c-terminalen Region des Axins bindet. PPA2

interagiert mit dem APC- β -catenin- Axin- GSK3 β Komplex um den Effekt des GSK3 β abzustimmen (Novak and Dedhar 1999).

Die Erkenntnis, dass bestimmte Proteine an unterschiedlichen biologischen Prozessen partizipieren und somit eine multifunktionale Charakteristik besitzen nimmt stetig zu. Ein Beispiel mit dieser Funktion ist das oben beschriebene β -Catenin, das einerseits durch Interaktion mit Membranproteinen wie Cadherin an der Zell-Zell Adhäsion beteiligt ist, andererseits als transkriptioneller Regulator im Zellkern durch Bindung an LEF/TCF die Transkription von Zielgenen reguliert (Zhurinsky, Shtutman et al. 2000). β -Catenin und Plakoglobin (γ -Catenin) sind homologe Proteine in der Zell-Zell Adhäsion um Membran assoziierte Cadherin Rezeptoren (adherens junctions) mit dem zellulären Actincytoskelett über die Bindung an α -Catenin zu verbinden. Zusätzlich ist Plakoglobin über die Bindung an Desmoglein und Desmocollin (Desmosomale Cadherine) involviert in die Bildung der Desmosomen und vermittelt dessen Interaktion mit den Intermediärfilamenten über die Bindung an Desmoplakin und Plakophilin. Wie das β -Catenin kann Plakoglobin frei im Zytoplasma vorliegen und durch die Bindung an Axin und Phosphorylierung durch GSK3- β über den Ubiquitin Proteasom Pathway abgebaut werden (Aberle, Bauer et al. 1997; Kodama, Ikeda et al. 1999). Plakoglobin kann mit denselben Proteinen interagieren wie β -Catenin und umgekehrt. Sie sind assoziiert mit dem tight junction Protein ZO1 (Zonula Occludens-1) (Rajasekaran, Hojo et al. 1996), dem EGF Rezeptor (Hoschuetzky, Aberle et al. 1994) sowie mit dem integralen Membranprotein fascin oder auch dem TATA bindenden Protein pontin-52 (Bauer, Huber et al. 1998). So führt ein hoher Level an Plakoglobin zu einer Verdrängung aus den adherens junctions und schließlich zum Abbau von β -Catenin (Salomon, Sacco et al. 1997). In Plakoglobin Knockout Mäusen wird β -Catenin in den Desmosomen eingebaut, in denen normalerweise nur Plakoglobin verwendet wird (Bierkamp, Schwarz et al. 1999). Umgekehrt kann jedoch das Plakoglobin das β -Catenin nicht ersetzen, wie ein Vergleich in den Knockout Mäusen für Plakoglobin oder β -Catenin zeigt. Plakoglobin Knockout Mäuse zeigen keine Abnormalitäten, während bei den β -Catenin Knockout Mäusen Störungen in der Ektoderm- und Mesodermbildung zu erkennen ist (Haegel, Larue et al. 1995). Plakoglobin gehört wie auch β -Catenin zur Armadillo Familie (Arm repeats) besteht aus 745 Aminosäuren und ist auf Chromosom 17q21 lokalisiert. β -Catenin ist hingegen auf dem Chromosom 3p21 lokalisiert worden (Kraus, Liehr et al. 1994). Eine charakteristische Struktur der Catenine ist die zentrale aus 42 Aminosäuren bestehende Armadillo Domäne die aus multiplen Wiederholungen besteht und von C- und N- Terminalen Domänen begrenzt ist. Plakoglobin

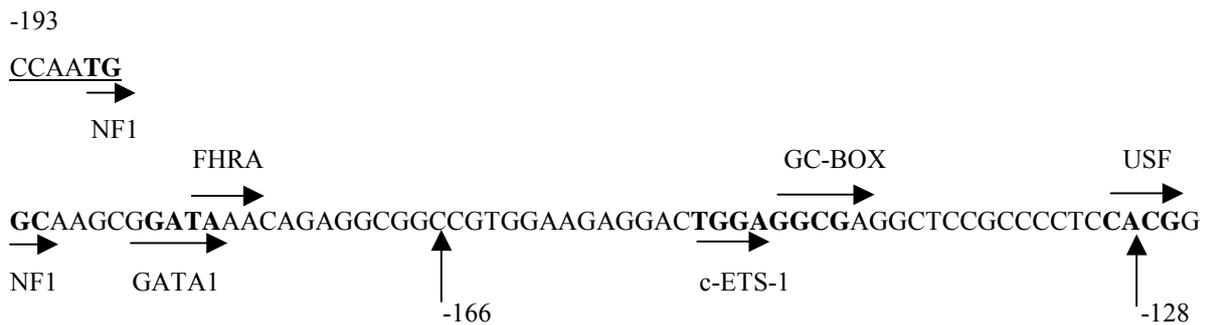
besitzt 13 dieser multiplen Wiederholungen in der Armadillo Domäne. Obwohl alle drei Domänen der Catenine eine Protein-Protein Interaktion unterstützen bindet die Mehrzahl der Bindungspartner innerhalb der Armadillo Domäne (Zhurinsky, Shtutman et al. 2000), die erstmals in dem Drosophila Genprodukt Armadillo identifiziert wurde (Peifer and Wieschaus 1990). Da die Bindung von Cateninen zu Cadherinen durch die Armadillo Domäne unterstützt wird durch Deletionen innerhalb der C-Terminalen Domäne, zeigt sich diese als verantwortliche Domäne für die desmosomale Lokalisation von Plakoglobin (Chitaev, Leube et al. 1996; Troyanovsky, Chitaev et al. 1996).

Der Transkriptionsfaktor LEF1 (Lymphoid enhancer-binding factor 1) ist ein Mitglied der HMG Familie (high-mobility group) die an die Nukleotidsequenz CCTTTGAACT bindet, in lymphatischen Zellenlinien exprimiert ist und auch an der Organentwicklung der Maus beteiligt ist (Oosterwegel, van de Wetering et al. 1993). Ebenso wie LEF1 besitzt TCF1 (T-cell factor 1) eine HMG DNA bindende Domäne und zeigt damit die nahe Verwandtschaft zu dieser Gruppe ebenso wie TCF3 und TCF4 (Hsu, Galceran et al. 1998). Untersuchungen zum Transkriptionsfaktor LEF1 haben gezeigt, dass dieses Protein kein selbstständiges transkriptionelles Potential besitzt und somit auf einen entsprechenden Bindungspartner angewiesen ist, um die Transkription zu aktivieren (Travis, Amsterdam et al. 1991; Carlsson, Waterman et al. 1993). β -Catenin kann sowohl LEF/TCF als auch TBP binden und somit die Transkription aktivieren. Es ist bereits bekannt, dass Plakoglobin nicht nur an TCF/LEF binden kann, sondern auch in dieser Funktion im Zellkern lokalisiert ist (Hecht, Litterst et al. 1999; Zhurinsky, Shtutman et al. 2000). Ebenso scheint Plakoglobin über die Bindung an TCF/LEF die Transkription aktivieren zu können (Daten B. Steffen, noch nicht publiziert). Über die Funktion von Plakoglobin als transkriptioneller Aktivator bietet sich eine weitere Erklärung an. Das Plakoglobin die Funktion von β -Catenin in der Zell-Zell Adhäsion und der Bildung von Adherens junctions übernehmen kann sorgt für eine Anhäufung von β -Catenin im Zytoplasma und schließlich zur Translokation in den Zellkern. Dies wäre ein Indiz für eine Art Ersatzfunktion von β -Catenin durch Plakoglobin, wodurch β -Catenin die Funktion als transkriptioneller Aktivator übernehmen kann. Hinweisgebend dafür ist, dass es bei einer Überexpression von Plakoglobin zu einem Abbau von β -Catenin über den Ubiquitin/Proteasom Pathway kommt (Simcha, Shtutman et al. 1998; Miller, Hocking et al. 1999). Andererseits ist auch gezeigt worden, dass LEF1 durchaus in der Lage ist in Verbindung mit Plakoglobin an die DNA zu binden. Diese Bindung scheint aber sehr ineffektiv zu sein (Zhurinsky, Shtutman et al. 2000).

Das der Promotor von Plakoglobin durch das Fusionsprotein AML1-ETO reguliert wird konnte in den Experimenten demonstriert werden. Auch eine für die höhere Expression durch das Fusionsprotein mitverantwortliche Region innerhalb des Promotors, die sich über sechs Basenpaare erstreckt, konnte identifiziert werden. Ist diese Region innerhalb des Promotors nicht vorhanden, so ist auch eine Regulation durch AML1-ETO nicht mehr zu beobachten. Die Regulation durch das Fusionsprotein AML1-ETO ist jedoch nicht allein innerhalb dieser Region lokalisiert. Hier zeigen die Ergebnisse, dass ein weiterer Bereich für diese Regulation notwendig ist. Die Untersuchung der Promotorsequenz auf Bindestellen von Transkriptionsfaktoren enthüllte eine Reihe von in Frage kommenden Sequenzen innerhalb des Promotors, deren bindende Transkriptionsfaktoren durch das Fusionsprotein AML1-ETO beeinflusst werden könnte. Es zeigte aber auch, dass keine AML1 Bindestelle vorhanden ist und das Fusionsprotein somit nicht selbst an die DNA binden kann.

Da sich innerhalb der sechs Basenpaare der regulierenden Region eine CCAAT Sequenz vorkommt, liegt der Verdacht nahe, dass der Transkriptionsfaktor c/EBP α eventuell eine Rolle spielen könnte. Der Transkriptionsfaktor c/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein α) wird zur bZIP (basic region leucin zipper) Familie gerechnet. Wie c/EBP α gehören auch c/EBP β , c/EBP γ , c/EBP δ und c/EBP ϵ zu dieser Familie, die sich in zwei unterschiedlichen Transaktivierungsdomänen innerhalb der N-terminalen Region unterscheiden (Wilson, McFie et al. 2001). Die Mitglieder der Familie bilden mit der C-terminalen basic Leucin Zipper Domäne Hetero- und Homodimere (Keeshan, Santilli et al. 2003). Die Versuche zu einer möglichen Regulation durch den Transkriptionsfaktor c/EBP α zeigten, dass der Einfluss von c/EBP α auf den Promotor praktisch nicht vorhanden ist. Es konnte allerdings ein anderer Effekt in den Versuchen beobachtet werden. Es zeigte sich, dass die Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von c/EBP α zu einer Reprimierung der AML1-ETO Regulation führt (Pabst, Mueller et al. 2001). Diese Unterdrückung durch das Fusionsprotein führt jedoch nicht dazu, dass es zu einer normalen Promotorregulation kommt. Die Herstellung der unterschiedlichen Mutationen in der regulierenden 10 bp Region des Promotors machen ebenfalls deutlich, dass die CCAAT Sequenz nichts mit der Regulation durch das Fusionsprotein AML1-ETO zu tun hat.

Dass diese Region dennoch eine wichtige Funktion hat, konnte gezeigt werden. Welche Funktion dieser Region zukommt ist nicht geklärt, es ist aber denkbar, dass diese Region lediglich als eine Art Spacer für Transkriptionsfaktoren verwendet wird, deren eigentliche Bindestelle sich aber nicht innerhalb dieses Bereiches befindet.



NF1 = Nuclear factor 1
 FHRA = Fork head related activator
 USF = Upstream stimulating factor

In dieser Darstellung ist die Plakoglobin-Promotorregion -193 bis -128 mit den wichtig erscheinenden Transkriptionsfaktor-Bindestellen aufgeführt (siehe Tabelle 14, Seite 76).

In einem weiteren Versuch wurden acht verschiedene Mutanten des Fusionsproteine AML1-ETO sowie als Referenzen das nicht mutierte Fusionsprotein und der Transkriptionsfaktor ETO in einem Luziferase-Assay zusammen mit dem Plakoglobin Promotorfragment $-197/+11$ getestet. Dieser Versuch wurde durchgeführt, um die Domänen auf dem Fusionsprotein zu identifizieren, die für eine Regulation verantwortlich sind (siehe Seite 84). Das Ergebnis des Versuches zeigt eine Beteiligung der RHD (runt homolgy domain), die vollständig auf dem AML1 Gen lokalisiert ist. Die RHD Domäne auf dem AML1 Gen ist normalerweise an der DNA Bindung beteiligt. Ein weiterer wichtiger Bereich, der einen großen Einfluss zu haben scheint, ist der Bereich 350-428 (Mutante Δ 350-428). Hier sinkt die Aktivität auf 9% und zeigt damit den stärksten Einfluss auf die Regulation. Dieser Bereich liegt zwischen der TAF Domäne (transcription-activation factor) und der HHR Domäne (hydrophobic heptad repeat) und ist bislang nicht näher in seiner Funktion beschrieben. Eine weitere Funktion in der Regulation kann der Zn-F Domäne (zinc finger motif) zugeschrieben werden. Durch die Deletion in diesem Bereich liegt die Regulation noch bei 46%. Auch ein Einfluss der HHR Domäne kann beobachtet werden, zeigt aber mit 66% Aktivität von den vier Motiven den geringsten Einfluss.

Ausblick

In der U937 Zelllinie konnte in Westernblot Untersuchungen gezeigt werden, dass das ID2 Gen durch die Fusionsproteine AML1-ETO, PML-RAR α und PLZF-RAR α reprimiert wird. Die Funktion des ID2 Gens (Inhibitor of differentiation) ist, wie in der Diskussion zum ID2 Gen näher erläutert, die eines Inhibitors von Transkriptionsfaktoren. Diese Inhibition äußert sich in darin, dass ID2 Protein an Transkriptionsfaktoren bindet und ein Heterodimer bildet. Aufgrund der fehlenden DNA-Bindedomäne des ID2 Proteins kann das Heterodimer aber nicht an die DNA binden und eine entsprechende Regulation nicht stattfinden. An welche Transkriptionsfaktoren das ID2 Protein binden kann ist weitgehend unbekannt.

Eine direkte Möglichkeit Proteine zu Identifizieren, an die das ID2 Protein bindet, stellt das „Two hybrid“ System dar. In diesem System können Proteine an die das ID2 Protein bindet aus dem Acrylamid Gel ausgeschnitten und durch Edmann Abbau die Aminosäuren bestimmt werden.

Bei dem bereits klonierte Promotorfragment mit einer Länge 345 bp konnte eine Regulation durch die Fusionsproteine nicht festgestellt werden. Eine Regulation auf Promotorebene ist dennoch nicht auszuschliessen, weil das vorhandene Promotorfragment mit 345 bp zu kurz erscheint um eine korrekte Aussage über die Regulation machen zu können. Um zu untersuchen wo und wie die Fusionsproteine das ID2 Gens regulieren, sollte deshalb eine längere Promotorsequenz mittels PCR chromosomal amplifiziert und in den pGL3-Basic Vektor kloniert werden.

Die gleiche Aussage kann für das MEF Gen gemacht werden. Das zu klonierende Promotorstück sollte groß genug sein, und eine Länge von etwa 1kb aufweisen um eine Aussage machen zu können.

Da für das MEF Gen zur Zeit noch kein Antikörper erhältlich ist, wäre es sinnvoll, das Gen in einen Expressionsvektor zu klonieren der zum Beispiel ein His-Tag aufweist. Dadurch könnten weitere Untersuchungen auf Proteinebene durchgeführt werden.

Für die Regulation des Plakoglobin Gens (γ -Catenin) durch das Fusionsprotein AML1-ETO konnte innerhalb des Promotors eine wichtige Sequenz lokalisiert werden. Die Mutationen zeigten allerdings, dass diese Sequenz für die Regulation des Fusionsproteins nicht alleine verantwortlich ist. Es muss ein weiterer Bereich innerhalb des Promotors gefunden werden, der essentiell für die Regulation durch das AML1-ETO ist.

In der Darstellung auf Seite 99 sind die wesentlich erscheinenden Bindestellen für Transkriptionsfaktoren dargestellt (siehe Tabelle 14, Seite 76), bei denen das Fusionsprotein regulatorisch einwirken könnte. Bei dem Promotorfragment -166/+11 ist keine Promotoraktivität mehr vorhanden, was die Transkriptionsfaktoren GATA1 und FHRA für die Promotorregulation wesentlich erscheinen lässt. Um zu überprüfen, ob dies zutrifft müssen Mutationen innerhalb der Bindestellen eingefügt werden (in Fett dargestellt). In einem anschließenden Luziferase-Assay kann dann überprüft werden, ob einerseits Promotoraktivität vorhanden ist, und andererseits ob eine Regulation durch das Fusionsprotein AML1-ETO erfolgt. NF1 kann für eine Regulation ausgeschlossen werden, da die Mutation 4 (siehe Seite 81) bereits innerhalb der Bindestelle des Transkriptionsfaktors NF1 liegt.

Referenzen

- Aberle, H., A. Bauer, et al. (1997). "beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." Embo J 16(13): 3797-804.
- Asou, H., S. Tashiro, et al. (1991). "Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation." Blood 77(9): 2031-6.
- Atchley, W. R. and W. M. Fitch (1997). "A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors." Proc Natl Acad Sci U S A 94(10): 5172-6.
- Barone, M. V., R. Pepperkok, et al. (1994). "Id proteins control growth induction in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A 91(11): 4985-8.
- Bauer, A., O. Huber, et al. (1998). "Pontin52, an interaction partner of beta-catenin, binds to the TATA box binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A 95(25): 14787-92.
- Benezra, R., R. L. Davis, et al. (1990). "Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. Control of terminal myogenic differentiation." Ann N Y Acad Sci 599: 1-11.
- Benezra, R., R. L. Davis, et al. (1990). "The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins." Cell 61(1): 49-59.
- Bennett, J. M., R. D. Brunning, et al. (2002). "Myelodysplastic syndromes: from French-American-British to World Health Organization: a commentary." Blood 99(8): 3074-5.
- Ben-Ze'ev, A., M. Shtutman, et al. (2000). "The integration of cell adhesion with gene expression: the role of beta-catenin." Exp Cell Res 261(1): 75-82.
- Bierkamp, C., H. Schwarz, et al. (1999). "Desmosomal localization of beta-catenin in the skin of plakoglobin null-mutant mice." Development 126(2): 371-81.
- Biggs, J. R., Y. Zhang, et al. (1995). "Repression of the Id2 (inhibitor of differentiation) gene promoter during exit from the cell cycle." J Cell Physiol 164(2): 249-58.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-54.
- Bruhn, L., A. Munneryn, et al. (1997). "ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCRalpha enhancer function." Genes Dev 11(5): 640-53.
- Cabrera, C. V. and M. C. Alonso (1991). "Transcriptional activation by heterodimers of the achaete-scute and daughterless gene products of Drosophila." Embo J 10(10): 2965-73.
- Cabrera, C. V., M. C. Alonso, et al. (1987). "Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene." Cell 50(4): 659-63.
- Cadigan, K. M. and R. Nusse (1997). "Wnt signaling: a common theme in animal development." Genes Dev 11(24): 3286-305.
- Carlsson, P., M. L. Waterman, et al. (1993). "The hLEF/TCF-1 alpha HMG protein contains a context-dependent transcriptional activation domain that induces the TCR alpha enhancer in T cells." Genes Dev 7(12A): 2418-30.
- Chang, K. S., J. F. Lu, et al. (1992). "The t(15;17) breakpoint in acute promyelocytic leukemia cluster within two different sites of the myl gene: targets for the detection of minimal residual disease by the polymerase chain reaction." Blood 79(3): 554-8.
- Chaudhary, J., R. Mosher, et al. (2000). "Role of winged helix transcription factor (WIN) in the regulation of Sertoli cell differentiated functions: WIN acts as an early event gene for follicle-stimulating hormone." Endocrinology 141(8): 2758-66.
- Chen, G., J. Fernandez, et al. (1999). "A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in Drosophila development." Genes Dev 13(17): 2218-30.

- Chen, S. J., A. Zelent, et al. (1993). "Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic leukemia zinc finger genes resulting from t(11;17)(q23;q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia." *J Clin Invest* 91(5): 2260-7.
- Chitaev, N. A., R. E. Leube, et al. (1996). "The binding of plakoglobin to desmosomal cadherins: patterns of binding sites and topogenic potential." *J Cell Biol* 133(2): 359-69.
- Collins, M. D. and G. E. Mao (1999). "Teratology of retinoids." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39: 399-430.
- Collins, S. (2002). "The role of retinoids and retinoic acid receptors in normal hematopoiesis." *Leukemia* October 2002, Volume 16, Number 10, Pages 1896-1905.
- Collins, S. J., S. Tsai, et al. (1996). "Retinoic acid receptors in hematopoiesis." *Curr Top Microbiol Immunol* 211: 7-15.
- Copeland, N. G. and G. M. Cooper (1979). "Transfection by exogenous and endogenous murine retrovirus DNAs." *Cell* 16(2): 347-56.
- Crans, H. N. and K. M. Sakamoto (2001). "Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia." *Leukemia* 15(3): 313-31.
- Crepieux, P., J. Coll, et al. (1994). "The Ets family of proteins: weak modulators of gene expression in quest for transcriptional partners." *Crit Rev Oncog* 5(6): 615-38.
- Crews, S. T. (1998). "Control of cell lineage-specific development and transcription by bHLH-PAS proteins." *Genes Dev* 12(5): 607-20.
- Dang, C. V., C. Dolde, et al. (1992). "Discrimination between related DNA sites by a single amino acid residue of Myc-related basic-helix-loop-helix proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(2): 599-602.
- de The, H., P. Tiollais, et al. (1990). "The retinoic acid receptors." *Nouv Rev Fr Hematol* 32(1): 30-2.
- Deed, R. W., E. Hara, et al. (1997). "Regulation of Id3 cell cycle function by Cdk-2-dependent phosphorylation." *Mol Cell Biol* 17(12): 6815-21.
- Delattre, O., J. Zucman, et al. (1992). "Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours." *Nature* 359(6391): 162-5.
- Downing, J. R. (1999). "The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance." *Br J Haematol* 106(2): 296-308.
- Downing, J. R. (2001). "AML1/CBFbeta transcription complex: its role in normal hematopoiesis and leukemia." *Leukemia* 15(4): 664-5.
- Drexler, H. G., A. Borkhardt, et al. (1995). "Detection of chromosomal translocations in leukemia-lymphoma cells by polymerase chain reaction." *Leuk Lymphoma* 19(5-6): 359-80.
- Duprez, E., S. Ruchaud, et al. (1992). "A retinoid acid 'resistant' t(15;17) acute promyelocytic leukemia cell line: isolation, morphological, immunological, and molecular features." *Leukemia* 6(12): 1281-7.
- Erickson, P., J. Gao, et al. (1992). "Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, runt." *Blood* 80(7): 1825-31.
- Feinstein, P. G., K. Kornfeld, et al. (1995). "Identification of homeotic target genes in Drosophila melanogaster including nervy, a proto-oncogene homologue." *Genetics* 140(2): 573-86.
- Fenaux, P. and C. Chomienne (1996). "Biology and treatment of acute promyelocytic leukemia." *Curr Opin Oncol* 8(1): 3-12.
- Ferbeyre, G., E. de Stanchina, et al. (2000). "PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence." *Genes Dev* 14(16): 2015-27.
- Ferre-D'Amare, A. R., G. C. Prendergast, et al. (1993). "Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain." *Nature* 363(6424): 38-45.

- Fisher, A. and M. Caudy (1998). "The function of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions." Bioessays 20(4): 298-306.
- Fisher, A. L. and M. Caudy (1998). "Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates." Genes Dev 12(13): 1931-40.
- Germing, U., N. Gattermann, et al. (2000). "Validation of the WHO proposals for a new classification of primary myelodysplastic syndromes: a retrospective analysis of 1600 patients." Leukemia Research 24(12): 983-992.
- Giguere, V., E. S. Ong, et al. (1987). "Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid." Nature 330(6149): 624-9.
- Gluzman, Y. (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." Cell 23(1): 175-82.
- Goddard, A. D., J. Borrow, et al. (1991). "Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia." Science 254(5036): 1371-4.
- Golub, T. R., G. F. Barker, et al. (1995). "Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A 92(11): 4917-21.
- Golub, T. R., G. F. Barker, et al. (1994). "Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation." Cell 77(2): 307-16.
- Greenall, A., N. Willingham, et al. (2001). "DNA binding by the ETS-domain transcription factor PEA3 is regulated by intramolecular and intermolecular protein-protein interactions." J Biol Chem 276(19): 16207-15.
- Greenberger, J. S., R. J. Eckner, et al. (1983). "Interleukin 3-dependent hematopoietic progenitor cell lines." Fed Proc 42(10): 2762-71.
- Greenberger, J. S., M. A. Sakakeeny, et al. (1983). "Demonstration of permanent factor-dependent multipotential (erythroid/neutrophil/basophil) hematopoietic progenitor cell lines." Proc Natl Acad Sci U S A 80(10): 2931-5.
- Grignani, F., M. Fagioli, et al. (1994). "Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment." Blood 83(1): 10-25.
- Grignani, F., T. Kinsella, et al. (1998). "High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein." Cancer Res 58(1): 14-9.
- Grimwade, D., S. Langabeer, et al. (1998). "RT-PCR in diagnosis and disease monitoring of acute promyelocytic leukemia (APL)." Methods Mol Biol 89: 333-58.
- Grimwade, D., H. Walker, et al. (1998). "The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties." Blood 92(7): 2322-33.
- Grunstein, M. (1997). "Histone acetylation in chromatin structure and transcription." Nature 389(6649): 349-52.
- Guidez, F., S. Ivins, et al. (1998). "Reduced retinoic acid-sensitivities of nuclear receptor corepressor binding to PML- and PLZF-RARalpha underlie molecular pathogenesis and treatment of acute promyelocytic leukemia." Blood 91(8): 2634-42.
- Haegel, H., L. Larue, et al. (1995). "Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation." Development 121(11): 3529-37.
- Hagemeier, C., A. J. Bannister, et al. (1993). "The activation domain of transcription factor PU.1 binds the retinoblastoma (RB) protein and the transcription factor TFIID in vitro: RB shows sequence similarity to TFIID and TFIIB." Proc Natl Acad Sci U S A 90(4): 1580-4.

- Hara, E., M. Hall, et al. (1997). "Cdk2-dependent phosphorylation of Id2 modulates activity of E2A-related transcription factors." Embo J 16(2): 332-42.
- Hassan, B. A. and H. J. Bellen (2000). "Doing the MATH: is the mouse a good model for fly development?" Genes Dev 14(15): 1852-65.
- Hecht, A., C. M. Litterst, et al. (1999). "Functional characterization of multiple transactivating elements in beta-catenin, some of which interact with the TATA-binding protein in vitro." J Biol Chem 274(25): 18017-25.
- Hino, S., T. Michiue, et al. (2003). "Casein kinase I epsilon enhances the binding of Dvl-1 to Frat-1 and is essential for Wnt-3a-induced accumulation of beta-catenin." J Biol Chem 278(16): 14066-73.
- Hoschuetzky, H., H. Aberle, et al. (1994). "Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor." J Cell Biol 127(5): 1375-80.
- Hsu, S. C., J. Galceran, et al. (1998). "Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin." Mol Cell Biol 18(8): 4807-18.
- Hummel, J. L., T. Zhang, et al. (2002). "The Retinoic acid receptor alpha (RARalpha) chimeric proteins PML-, PLZF-, NPM-, and NuMA-RARalpha have distinct intracellular localization patterns." Cell Growth Differ 13(4): 173-83.
- Inoue, H., H. Nojima, et al. (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." Gene 96(1): 23-8.
- Ishiguro, A., K. S. Spirin, et al. (1996). "Id2 expression increases with differentiation of human myeloid cells." Blood 87(12): 5225-31.
- Jainchill, J. L., S. A. Aaronson, et al. (1969). "Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells." J Virol 4(5): 549-53.
- Jan, Y. N. and L. Y. Jan (1993). "HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis." Cell 75(5): 827-30.
- Jogi, A., P. Persson, et al. (2002). "Modulation of basic helix-loop-helix transcription complex formation by Id proteins during neuronal differentiation." J Biol Chem 277(11): 9118-26.
- Keeshan, K., G. Santilli, et al. (2003). "Transcription activation function of C/EBP{alpha} is required for induction of granulocytic differentiation." Blood 102(4): 1267-1275.
- Kitabayashi, I., K. Ida, et al. (1998). "The AML1-MTG8 leukemic fusion protein forms a complex with a novel member of the MTG8(ETO/CDR) family, MTGR1." Mol Cell Biol 18(2): 846-58.
- Kliwer, S. A., K. Umesono, et al. (1992). "Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling." Nature 355(6359): 446-9.
- Kodama, S., S. Ikeda, et al. (1999). "Axin directly interacts with plakoglobin and regulates its stability." J Biol Chem 274(39): 27682-8.
- Kozu, T., H. Miyoshi, et al. (1993). "Junctions of the AML1/MTG8(ETO) fusion are constant in t(8;21) acute myeloid leukemia detected by reverse transcription polymerase chain reaction." Blood 82(4): 1270-6.
- Kraus, C., T. Liehr, et al. (1994). "Localization of the human beta-catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development." Genomics 23(1): 272-4.
- Kurian, K. M., C. J. Watson, et al. (1999). "DNA chip technology." J Pathol 187(3): 267-71.
- Langlands, K., X. Yin, et al. (1997). "Differential interactions of Id proteins with basic-helix-loop-helix transcription factors." J Biol Chem 272(32): 19785-93.
- Lanotte, M., V. Martin-Thouvenin, et al. (1991). "NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3)." Blood 77(5): 1080-6.

- Lassar, A. B., R. L. Davis, et al. (1991). "Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo." Cell 66(2): 305-15.
- Ledent, V. and M. Vervoort (2001). "The basic helix-loop-helix protein family: comparative genomics and phylogenetic analysis." Genome Res 11(5): 754-70.
- Leid, M., P. Kastner, et al. (1992). "Multiplicity generates diversity in the retinoic acid signalling pathways." Trends Biochem Sci 17(10): 427-33.
- Li, L., H. Yuan, et al. (1999). "Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt- mediated regulation of LEF-1." Embo J 18(15): 4233-40.
- Li, L., H. Yuan, et al. (1999). "Dishevelled proteins lead to two signaling pathways. Regulation of LEF- 1 and c-Jun N-terminal kinase in mammalian cells." J Biol Chem 274(1): 129-34.
- Ling, Y., J. H. Lakey, et al. (1997). "Molecular characterization of the B-box protein-protein interaction motif of the ETS-domain transcription factor Elk-1." Embo J 16(9): 2431-40.
- Lohnes, D., M. Mark, et al. (1994). "Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (I). Craniofacial and skeletal abnormalities in RAR double mutants." Development 120(10): 2723-48.
- Lyden, D., A. Z. Young, et al. (1999). "Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts." Nature 401(6754): 670-7.
- Mangelsdorf, D. J., U. Borgmeyer, et al. (1992). "Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid." Genes Dev 6(3): 329-44.
- Mao, S., R. C. Frank, et al. (1999). "Functional and physical interactions between AML1 proteins and an ETS protein, MEF: implications for the pathogenesis of t(8;21)-positive leukemias." Mol Cell Biol 19(5): 3635-44.
- Martinsen, B. J. and M. Bronner-Fraser (1998). "Neural crest specification regulated by the helix-loop-helix repressor Id2." Science 281(5379): 988-91.
- Massari, M. E. and C. Murre (2000). "Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms." Mol Cell Biol 20(2): 429-40.
- Mellon, P., V. Parker, et al. (1981). "Identification of DNA sequences required for transcription of the human alpha 1-globin gene in a new SV40 host-vector system." Cell 27(2 Pt 1): 279-88.
- Melnick, A. and J. D. Licht (1999). "Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia." Blood 93(10): 3167-215.
- Mendelsohn, C., D. Lohnes, et al. (1994). "Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants." Development 120(10): 2749-71.
- Meyers, S., J. R. Downing, et al. (1993). "Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML- 1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions." Mol Cell Biol 13(10): 6336-45.
- Migliaccio, G., A. R. Migliaccio, et al. (1989). "Selection of lineage-restricted cell lines immortalized at different stages of hematopoietic differentiation from the murine cell line 32D." J Cell Biol 109(2): 833-41.
- Miller, J. R., A. M. Hocking, et al. (1999). "Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways." Oncogene 18(55): 7860-72.
- Mistry, A. R., E. W. Pedersen, et al. (2003). "The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease." Blood Rev 17(2): 71-97.

- Miyazaki, Y., X. Sun, et al. (1996). "MEF, a novel transcription factor with an Elf-1 like DNA binding domain but distinct transcriptional activating properties." Oncogene 13(8): 1721-9.
- Miyoshi, H., T. Kozu, et al. (1993). "The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript." Embo J 12(7): 2715-21.
- Miyoshi, H., K. Shimizu, et al. (1991). "t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1." Proc Natl Acad Sci U S A 88(23): 10431-4.
- Murre, C., P. S. McCaw, et al. (1989). "A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins." Cell 56(5): 777-83.
- Murre, C., P. S. McCaw, et al. (1989). "Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence." Cell 58(3): 537-44.
- Nishii, K., E. Usui, et al. (2003). "Characteristics of t(8;21) acute myeloid leukemia (AML) with additional chromosomal abnormality: concomitant trisomy 4 may constitute a distinctive subtype of t(8;21) AML." Leukemia 17(4): 731-7.
- Nisson, P. E., P. C. Watkins, et al. (1992). "Transcriptionally active chimeric gene derived from the fusion of the AML1 gene and a novel gene on chromosome 8 in t(8;21) leukemic cells." Cancer Genet Cytogenet 63(2): 81-8.
- Nosslinger, T., R. Reisner, et al. (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): 2935-41.
- Novak, A. and S. Dedhar (1999). "Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf." Cell Mol Life Sci 56(5-6): 523-37.
- Nusse, R. and H. E. Varmus (1982). "Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome." Cell 31(1): 99-109.
- Ohsako, S., J. Hyer, et al. (1994). "Hairy function as a DNA-binding helix-loop-helix repressor of Drosophila sensory organ formation." Genes Dev 8(22): 2743-55.
- Oosterwegel, M., M. van de Wetering, et al. (1993). "Differential expression of the HMG box factors TCF-1 and LEF-1 during murine embryogenesis." Development 118(2): 439-48.
- Pabst, T., B. U. Mueller, et al. (2001). "AML1-ETO downregulates the granulocytic differentiation factor C/EBPalpha in t(8;21) myeloid leukemia." Nat Med 7(4): 444-51.
- Papadopoulos, P., S. A. Ridge, et al. (1995). "The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL." Cancer Res 55(1): 34-8.
- Peifer, M. and P. Polakis (2000). "Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus." Science 287(5458): 1606-9.
- Peifer, M. and E. Wieschaus (1990). "The segment polarity gene armadillo encodes a functionally modular protein that is the Drosophila homolog of human plakoglobin." Cell 63(6): 1167-76.
- Peverali, F. A., T. Ramqvist, et al. (1994). "Regulation of G1 progression by E2A and Id helix-loop-helix proteins." Embo J 13(18): 4291-301.
- Polack, A., H. Delius, et al. (1984). "Two deletions in the Epstein-Barr virus genome of the Burkitt lymphoma nonproducer line Raji." Virology 133(1): 146-57.
- Polakis, P. (2000). "Wnt signaling and cancer." Genes Dev 14(15): 1837-51.
- Potter, E., S. Braun, et al. (2001). "Molecular cloning of a functional promoter of the human plakoglobin gene." Eur J Endocrinol 145(5): 625-33.

- Puccetti, E., B. Sennewald, et al. (2001). "Down-stream regions of the POZ-domain influence the interaction of the t(11;17)-associated PLZF/RARalpha fusion protein with the histone- deacetylase recruiting co-repressor complex." Hematol J 2(6): 385-92.
- Rabbitts, T. H. (1994). "Chromosomal translocations in human cancer." Nature 372(6502): 143-9.
- Rajasekaran, A. K., M. Hojo, et al. (1996). "Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions." J Cell Biol 132(3): 451-63.
- Riechmann, V., I. van Cruchten, et al. (1994). "The expression pattern of Id4, a novel dominant negative helix-loop-helix protein, is distinct from Id1, Id2 and Id3." Nucleic Acids Res 22(5): 749-55.
- Rijsewijk, F., M. Schuermann, et al. (1987). "The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless." Cell 50(4): 649-57.
- Rovera, G., M. Valtieri, et al. (1987). "Effect of Abelson murine leukemia virus on granulocytic differentiation and interleukin-3 dependence of a murine progenitor cell line." Oncogene 1(1): 29-35.
- Rowley, J. D. (2000). "Molecular genetics in acute leukemia." Leukemia 14(3): 513-7.
- Sacchi, S., D. Russo, et al. (1997). "All-trans retinoic acid in hematological malignancies, an update. GER (Gruppo Ematologico Retinoidi)." Haematologica 82(1): 106-21.
- Salomon, D., P. A. Sacco, et al. (1997). "Regulation of beta-catenin levels and localization by overexpression of plakoglobin and inhibition of the ubiquitin-proteasome system." J Cell Biol 139(5): 1325-35.
- Sambrook, J. and M. J. Gething (1989). "Protein structure. Chaperones, paperones." Nature 342(6247): 224-5.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A 74(12): 5463-7.
- Scandura, J. M., P. Boccuni, et al. (2002). "Transcription factor fusions in acute leukemia: variations on a theme." Oncogene 21(21): 3422-44.
- Scherer (1953). J. Exp. Med. 97: 695 (1953).
- Schmittgen, T. D. and B. A. Zakrajsek (2000). "Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR." J Biochem Biophys Methods 46(1-2): 69-81.
- Schmittgen, T. D., B. A. Zakrajsek, et al. (2000). "Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods." Anal Biochem 285(2): 194-204.
- Schneider, I. (1972). "Cell lines derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster." J Embryol Exp Morphol 27(2): 353-65.
- Seeber (2003). Leitlinien des Westdeutschen Tumorzentrums Essen.
- Sementchenko, V. I. and D. K. Watson (2000). "Ets target genes: past, present and future." Oncogene 19(55): 6533-48.
- Sharrocks, A. D., A. L. Brown, et al. (1997). "The ETS-domain transcription factor family." Int J Biochem Cell Biol 29(12): 1371-87.
- Sikder, H. A., M. K. Devlin, et al. (2003). "Id proteins in cell growth and tumorigenesis." Cancer Cell 3(6): 525-30.
- Simcha, I., M. Shtutman, et al. (1998). "Differential nuclear translocation and transactivation potential of beta-catenin and plakoglobin." J Cell Biol 141(6): 1433-48.
- Speck, N. A. and S. Terry (1995). "A new transcription factor family associated with human leukemias." Crit Rev Eukaryot Gene Expr 5(3-4): 337-64.
- Sun, X. H., N. G. Copeland, et al. (1991). "Id proteins Id1 and Id2 selectively inhibit DNA binding by one class of helix-loop-helix proteins." Mol Cell Biol 11(11): 5603-11.

- Tenen, D. G., R. Hromas, et al. (1997). "Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia." Blood 90(2): 489-519.
- Travis, A., A. Amsterdam, et al. (1991). "LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]." Genes Dev 5(5): 880-94.
- Troyanovsky, R. B., N. A. Chitaev, et al. (1996). "Cadherin binding sites of plakoglobin: localization, specificity and role in targeting to adhering junctions." J Cell Sci 109 (Pt 13): 3069-78.
- Valtieri, M., D. J. Tweardy, et al. (1987). "Cytokine-dependent granulocytic differentiation. Regulation of proliferative and differentiative responses in a murine progenitor cell line." J Immunol 138(11): 3829-35.
- Van Doren, M., H. M. Ellis, et al. (1991). "The Drosophila extramacrochaetae protein antagonizes sequence-specific DNA binding by daughterless/achaete-scute protein complexes." Development 113(1): 245-55.
- Van Doren, M., P. A. Powell, et al. (1992). "Spatial regulation of proneural gene activity: auto- and cross-activation of achaete is antagonized by extramacrochaetae." Genes Dev 6(12B): 2592-605.
- Vangala, R. K., M. S. Heiss-Neumann, et al. (2003). "The myeloid master regulator transcription factor PU.1 is inactivated by AML1-ETO in t(8;21) myeloid leukemia." Blood 101(1): 270-7.
- Vardiman, J. W., N. L. Harris, et al. (2002). "The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms." Blood 100(7): 2292-302.
- Vigushin, D. M., S. Ali, et al. (2001). "Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo." Clin Cancer Res 7(4): 971-6.
- Vogt, P. K. (2001). "Jun, the oncoprotein." Oncogene 20(19): 2365-77.
- Weintraub, H. (1993). "The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds." Cell 75(7): 1241-4.
- Westendorf, J. J., C. M. Yamamoto, et al. (1998). "The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP-alpha, inhibits C/EBP-alpha-dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation." Mol Cell Biol 18(1): 322-33.
- Willert, K. and R. Nusse (1998). "Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling." Curr Opin Genet Dev 8(1): 95-102.
- Wilson, H. L., P. J. McFie, et al. (2001). "Characterization of domains in C/EBPalpha that mediate its constitutive and cAMP-inducible activities." Mol Cell Endocrinol 181(1-2): 27-34.
- Wodarz, A. and R. Nusse (1998). "Mechanisms of Wnt signaling in development." Annu Rev Cell Dev Biol 14: 59-88.
- Xu, M., L. Nie, et al. (2003). "STAT5-induced Id-1 transcription involves recruitment of HDAC1 and deacetylation of C/EBPbeta." Embo J 22(4): 893-904.
- Yan, W., A. Z. Young, et al. (1997). "High incidence of T-cell tumors in E2A-null mice and E2A/Id1 double-knockout mice." Mol Cell Biol 17(12): 7317-27.
- Yokota, Y., A. Mansouri, et al. (1999). "Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2." Nature 397(6721): 702-6.
- Yuan, Y., L. Zhou, et al. (2001). "AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations." Proc Natl Acad Sci U S A 98(18): 10398-403.
- Zaccaria, A., A. Valenti, et al. (2002). "Cryptic translocation of PML/RARA on 17q. A rare event in acute promyelocytic leukemia." Cancer Genet Cytogenet 138(2): 169-73.
- Zhang, J., B. A. Hug, et al. (2001). "Oligomerization of ETO is obligatory for corepressor interaction." Mol Cell Biol 21(1): 156-63.

- Zhurinsky, J., M. Shtutman, et al. (2000). "Differential mechanisms of LEF/TCF family-dependent transcriptional activation by beta-catenin and plakoglobin." Mol Cell Biol 20(12): 4238-52.
- Zhurinsky, J., M. Shtutman, et al. (2000). "Plakoglobin and beta-catenin: protein interactions, regulation and biological roles." J Cell Sci 113 (Pt 18): 3127-39.

Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas möchte ich mich bei Prof. Dr. H. Serve und Dr. C. Müller-Tidow bedanken, die jederzeit mit Diskussionsbereitschaft und konstruktiver Kritik zur Erstellung dieser Arbeit beitrugen.

Für die Betreuung dieser Arbeit möchte ich mich bedanken bei Prof. Dr. H. Pape.

Ebenfalls möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit sowie für Durchsicht des Manuskripts bei Dr. B. Steffen bedanken.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Frau Prof. Dr. Köhler aus der Pathologie des UKM Münster, für die histologischen Untersuchungen der Mausproben.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit während dieser Zeit.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt, alle in Anspruch genommenen Quellen und Hilfsmittel in der Dissertation angegeben habe und die Dissertation nicht bereits anderweitig als Prüfungsarbeit vorgelegen hat.

Münster den 21.10.2003

Thomas Cauvet