

Strukturfunktionsanalyse des Translokationsprodukts AML1- ETO zur Entwicklung gezielter therapeutischer Ansätze

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main



von
Daniela Hildebrand
aus Offenbach am Main

Frankfurt am Main 2002
DF1

Vom Fachbereich Biologie und Informatik der Johann Wolfgang Goethe-Universität als
Dissertation angenommen.

| | |
|------------------------|----------------------------------|
| Dekan: | Prof. Dr. Bruno Streit |
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz |
| 2. Gutachter: | PD Dr. Barbara Schnierle |
| Datum der Disputation: | 26. August 2002 |

In Gedenken an meinen Großvater Günther Flick

Ein schöner, süßer Zeitvertreib!

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Krebs entsteht in mehreren Schritten | 1 |
| 1.2 | Leukämien | 2 |
| 1.2.1 | Klassifizierung der Leukämien | 3 |
| 1.2.2 | Pathogenese akuter Leukämien | 5 |
| 1.2.3 | Häufigkeit akuter Leukämien | 6 |
| 1.2.4 | Therapie der akuten myeloischen Leukämie | 6 |
| 1.3 | Molekulare Mechanismen in der Entstehung akuter Leukämien | 7 |
| 1.3.1 | Veränderungen von Transkriptionsfaktoren bei akuten Leukämien | 8 |
| 1.3.2 | Funktion des Transkriptionsfaktors AML1 während der hämatopoetischen Differenzierung und in der akuten myeloischen Leukämie | 9 |
| 1.3.2.1 | Der AML1/CBF β -Transkriptionsfaktor-Komplex in der Hämatopoese.. | 9 |
| 1.3.2.2 | AML1 als transkriptioneller Aktivator | 11 |
| 1.3.2.3 | AML1 als transkriptioneller Repressor | 12 |
| 1.3.2.4 | Bedeutung von AML1 in der Leukämieentstehung | 14 |
| 1.3.2.5 | AML1 und AML1-ETO: Vom Transaktivator zum Corepressor | 17 |
| 1.3.3 | Klinische Bedeutung von Histon-Deacetylase-Inhibitoren in der Therapie akuter Leukämien | 21 |
| 1.4 | Zielsetzung der Arbeit | 23 |
| 2 | Material und Methoden | 25 |
| 2.1 | Materialien | 25 |
| 2.1.1 | Geräte und Verbrauchsmaterialien | 25 |
| 2.1.2 | Zentrifugen | 26 |
| 2.1.3 | Chemikalien und Biochemikalien; Medien und Zusätze für die Zellkultur | 26 |
| 2.1.4 | Radioaktive Reagenzien | 27 |
| 2.1.5 | Enzyme | 28 |
| 2.1.6 | Antikörper | 28 |
| 2.1.7 | Marker und Größenstandards | 28 |
| 2.1.8 | Oligonucleotide | 28 |
| 2.1.9 | Eukaryotische Expressionsvektoren | 30 |
| 2.1.10 | Der retrovirale Vektor PINCO | 32 |
| 2.1.11 | Bakterienstämme | 32 |
| 2.1.12 | Medien für die Bakterienkultur | 33 |
| 2.1.12.1 | 5fach LB-Flüssigmedium | 33 |
| 2.1.12.2 | LB-Agar | 33 |
| 2.2 | Molekularbiologische Methoden | 34 |
| 2.2.1 | Arbeiten mit E.coli und Präparation von Plasmid-DNA | 34 |
| 2.2.1.1 | Transformation kompetenter Bakterienstämme | 34 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.2.1.2 | Plasmid-Minipräparation durch Alkalische Lyse | 34 |
| 2.2.1.3 | Plasmid-Maxipräparation über Caesiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation | 35 |
| 2.2.1.4 | Herstellung kompetenter Bakterienstämme nach der Rubidiumchlorid-Methode | 36 |
| 2.2.2 | Enzymatische Modifikationen von Nucleinsäuren | 36 |
| 2.2.2.1 | Restriktion von Plasmid-DNA | 36 |
| 2.2.2.2 | Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA | 37 |
| 2.2.2.3 | Auffüllen von überhängenden DNA-Enden | 37 |
| 2.2.2.4 | Ligation von DNA | 38 |
| 2.2.3 | Amplifizierung von DNA-Sequenzen durch PCR | 38 |
| 2.2.4 | Mutagenese-PCR | 41 |
| 2.2.5 | Hybridisierung von Oligonucleotiden | 41 |
| 2.2.6 | Agarosegele | 42 |
| 2.2.6.1 | Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese | 42 |
| 2.2.6.2 | Isolierung von DNA aus Agarosegelen | 43 |
| 2.2.7 | Bestimmung der DNA-Konzentration | 43 |
| 2.2.8 | Arbeiten mit Proteinen | 43 |
| 2.2.8.1 | <i>In-vitro</i> -Translation | 43 |
| 2.2.8.2 | Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen | 44 |
| 2.2.8.3 | Herstellung von Zell-Lysaten aus adhärenenten Zellen | 45 |
| 2.2.8.4 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 46 |
| 2.2.8.5 | Western Blot | 46 |
| 2.2.8.6 | Immunologische Detektion der Proteine | 47 |
| 2.2.8.7 | Coomassie-Färbung | 48 |
| 2.2.8.8 | Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen durch Coimmunpräzipitation | 48 |
| 2.2.8.9 | Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mittels GST-pull-down Assay | 49 |
| 2.2.8.10 | Bestimmung des Molekulargewichts hochmolekularer Protein-komplexe mit Hilfe der Größenausschluß-Chromatographie | 49 |
| 2.3 | Zellbiologische Methoden | 50 |
| 2.3.1 | Kultivierung humaner Zelllinien | 50 |
| 2.3.2 | Zelllinien | 51 |
| 2.3.2.1 | 293T | 51 |
| 2.3.2.2 | Kasumi-1 | 51 |
| 2.3.2.3 | Jurkat | 51 |
| 2.3.3 | Luziferase-Reporter-Testsystem zur Bestimmung transkriptioneller Repression anhand der Luziferase-Aktivität (<i>In-vitro</i> -Repressionstest) | 52 |
| 2.3.4 | Transiente Calciumphosphat-Transfektion von 293T-Zellen zur Produktion von Virusüberstand | 52 |
| 2.3.5 | Transduktion hämatopoetischer Zellen | 54 |
| 2.3.6 | Titerbestimmung auf 293T-Zellen mittels FACS-Analyse..... | 54 |
| 3 | Ergebnisse | 56 |
| 3.1 | Charakterisierung der "Repressor"-Domänen in ETO | 56 |
| 3.1.1 | Das Testsystem | 56 |
| 3.1.2 | Konstruktion der GAL4-ETO-Konstrukte | 57 |
| 3.1.3 | Funktionelle Untersuchung der ETO-Deletionsmutanten im <i>In-vitro</i> -Repressionstest | 61 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.2 | Identifizierung der ETO-Interaktionspartner | 64 |
| 3.2.1 | Untersuchung der ETO-N-CoR-Interaktion | 64 |
| 3.2.1.1 | Konstruktion und Expression von GST-ETO-Fusionsproteinen – Teil 1 | 65 |
| 3.2.1.2 | "GST pull-down"-Versuche – Teil 1 | 68 |
| 3.2.1.3 | Konstruktion und Expression von GST-ETO-Fusionsproteinen – Teil 2/"GST pull-down"-Versuche – Teil 2 | 71 |
| 3.2.2 | Untersuchung der ETO-mSin3A-Interaktion | 73 |
| 3.3 | Untersuchung der ETO-Homodimerisierung | 76 |
| 3.4 | Bestimmung der HMW-Komplexbildung durch Größen- ausschluß-Chromatographie | 78 |
| 3.5 | Konstruktion von "Aktivator-Proteinen" | 80 |
| 3.5.1 | Auswahl der ETO-bindenden Domäne | 80 |
| 3.5.2 | Auswahl der Aktivierungsdomänen | 81 |
| 3.5.3 | Klonierung der "Aktivator-Konstrukte" NC-VP16 und NC-KBP | 82 |
| 3.6 | Untersuchung der "Aktivator-Proteine" im <i>In-vitro</i>- Repressionstest | 84 |
| 3.7 | Nachweis der ETO-NC-VP16-Interaktion | 87 |
| 3.8 | Transduktion hämatopoetischer Zellen mit NC-VP16 | 88 |
| 3.8.1 | Herstellung des retroviralen Vektors PINCO-NC-VP16 | 88 |
| 3.8.2 | Transduktionsexperimente | 89 |
| 4 | Diskussion | 95 |
| 4.1 | Struktur und Funktion einer minimalen Repressor- Domäne in ETO | 96 |
| 4.1.1 | Eine "Core repressor Domäne" (CRD) vermittelt unabhängig von N-CoR transkriptionelle Repression | 96 |
| 4.1.2 | Die durch ETO vermittelte Repression hängt nur teilweise von der Anwesenheit der NHR2-Domäne ab | 97 |
| 4.1.3 | Die CRD vermittelt die Bindung an mSin3A | 97 |
| 4.2 | Optimale ETO-Funktion wird durch die Kooperation mehrerer Regionen erzielt | 99 |
| 4.2.1 | Maximale transkriptionelle Repression entsteht durch das Zusammenspiel mehrerer Domänen | 99 |
| 4.2.2 | Die ETO-N-CoR-Interaktion erfordert auch die Anwesenheit der NHR3-Domäne | 100 |
| 4.2.3 | Die Bildung hochmolekularer Gewichtskomplexe erfordert eine intakte ETO-Struktur | 100 |
| 4.3 | Die Stabilität des Corepressor-Komplexes beruht möglicherweise auf der Interaktion zweier Corepressor- Proteine | 102 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.4 | Hemmung der ETO-vermittelten Repression – "Proof of principle" | 103 |
| 4.4.1 | Lösungsvorschläge | 104 |
| 4.5 | Mögliche Therapieansätze für die Behandlung von Leukämien in der Zukunft | 106 |
| 5 | Zusammenfassung | 108 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 110 |
| 7 | Abkürzungsverzeichnis | 120 |

1 Einleitung

Krebs gilt als "Erkrankung" der Gene. Seit Wissenschaftler damit begonnen haben, die molekularen Grundlagen dieser Erkrankung zu erforschen, war es ihr Ziel, neue verbesserte und effektivere Therapieformen zu entwickeln. Mit der Zeit stellte sich dabei heraus, daß es sich bei Krebs nicht um eine Krankheit handelt, die mit einer einzigen "universellen" Therapie geheilt werden kann. Der Grund hierfür liegt in der extrem großen Diversität und Heterogenität dieser Krankheit. Und dennoch: Man kennt mittlerweile eine kleine Anzahl von "entscheidenden Schritten", deren Zusammenspiel für die Entwicklung aller Arten von Krebs erforderlich ist - und genau hier liegen die Ansatzpunkte für erfolgsversprechende Therapieformen.

1.1 Krebs entsteht in mehreren Schritten

Per definitionem bezeichnet der Begriff "Krebs" maligne (bösartige) Tumoren, die sich von benignen (gutartigen) Tumoren durch infiltratives und destruktives Wachstum sowie durch die Fähigkeit zur Metastasenbildung unterscheiden. Im menschlichen Organismus entsteht Krebs in mehreren Schritten, wobei diese Schritte genetische Veränderungen darstellen, die dazu führen, daß sich normale Zellen in hochgradig maligne Abkömmlinge verwandeln. Die wesentlichen Veränderungen in der Physiologie einer Zelle auf dem Weg zur Tumorzelle sind nach Hanahan und Weinberg folgende Eigenschaften: die Unabhängigkeit gegenüber Wachstumssignalen, die Unempfindlichkeit gegenüber wachstumsinhibierenden Signalen, das Überwinden von Apoptose, ein grenzenloses Replikationspotential sowie die Einwanderung in Gewebe und Metastasierung. Diese fünf Eigenschaften sind Merkmale der meisten, wenn nicht sogar aller Arten von Tumoren. Aber eine Mutation allein ist nicht ausreichend, sondern erst das kollektive Zusammenspiel mehrerer Mutationen führt zur Malignität einer Zelle. Das erklärt auch zumindest teilweise, warum die Entstehung einer Krebszelle aus zellbiologischer Sicht ein so seltenes Ereignis darstellt. Da im menschlichen Organismus im Laufe eines Lebens durchschnittlich 10^{16} Zellteilungen stattfinden und spontane Mutationen mit einer Häufigkeit von 10^{-6} pro Gen und Zellteilung eintreten, hätte jedes einzelne Gen 10^{10} mal die Gelegenheit zu mutieren. Daß Krebs aber dennoch "nur" in einem von drei Individuen vorkommt, verdeutlicht die Wirksamkeit von Mechanismen, die der Tumorentstehung entgegenwirken und unter deren Aufsicht alle somatischen Zellen stehen [Evan & Vousden, 2001, Abb. 1].

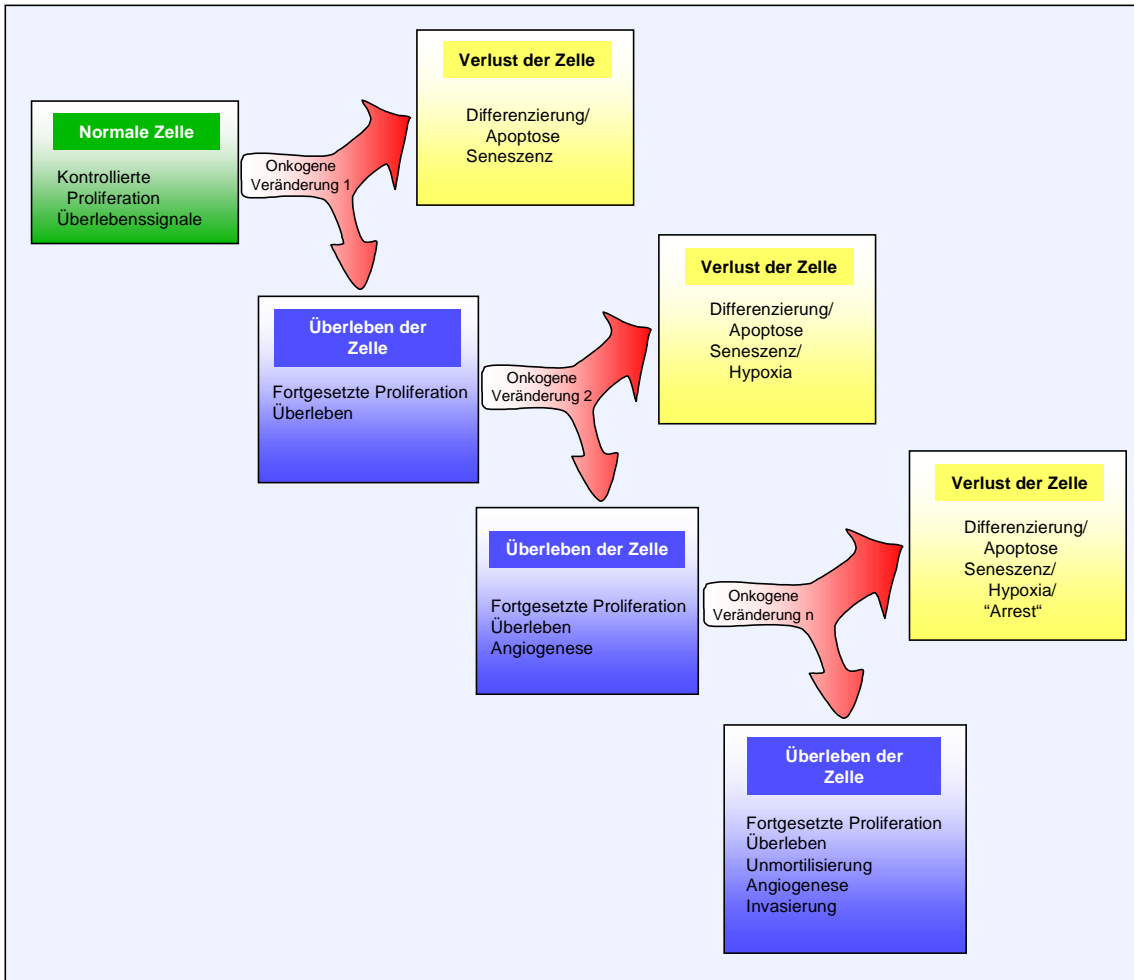


Abb. 1: Die Entstehung von Krebs ist komplexer als eine bloße lineare Anhäufung von onkogenen Mutationen. Potentiell onkogene Proliferationssignale treten zusammen mit verschiedenen wachstumshemmenden Prozessen wie z. B. Apoptose, Differenzierung oder Seneszenz auf, die alle eine nachfolgende klonale Expansion behindern. Zur Tumorentstehung kommt es nur, wenn diese wachstumshemmenden Mechanismen von Mutationen kompensiert werden. [Nach: Evan & Vousden, 2001]

1.2 Leukämien

Im Gegensatz zu Karzinomen und Sarkomen, die primär einen Zellverband bilden und daher als "solide" Tumoren bezeichnet werden, handelt es sich bei Leukämien um Neoplasien des hämatopoetischen Systems, die primär als "nicht-solide" Tumoren wachsen. Die Pathogenese solider und nicht-solider Tumoren umfasst gemeinsame Schritte, wobei solide Tumoren auf dem Weg zum vollen malignen Phänotyp noch zusätzliche Stadien durchlaufen. Diese hängen u. a. mit dem Verlust des Kontakts der Zellen miteinander und zu umgebenden Strukturen sowie der Invasion des Bindegewebes und von Blut- und Lymphgefäßen zusammen [Wagener, 1999]. Eine

leukämische Zellpopulation entsteht durch klonale Proliferation aus einer einzigen abnormen Stamm- oder Vorläuferzelle im Knochenmark. Nachfolgende Teilungsschritte führen dann zur Entstehung von Zellgenerationen, die alle von der ursprünglichen, pathologisch veränderten Zelle abstammen. Sobald die dabei gebildete Population von monoklonalen Zellen groß genug ist, kommt es zur Entwicklung klinischer Symptome. So ist für diese Gruppe von Erkrankungen die Ansammlung pathologisch veränderter Leukozyten im Knochenmark charakteristisch, was zu einer Knochenmarkinsuffizienz und zu erhöhten Leukozytenzahlen im peripheren Blut führen kann. Außerdem können die abnormen Zellen auch andere Organe wie z. B. Leber, Milz, Lymphknoten, Gehirn, Haut oder Hoden infiltrieren [Hoffbrand et al., 1997].

1.2.1 Klassifizierung der Leukämien

In diesem Abschnitt wird ein kurzer Überblick über die verschiedenen Leukämiearten gegeben. Da in dieser Arbeit die akute myeloische Leukämie (AML) im Vordergrund steht, wird im folgenden der Schwerpunkt auf diese Leukämieform gelegt.

Man unterscheidet zunächst akute und chronische Leukämien. Beide Hauptgruppen werden dann aufgrund der Ergebnisse zytochemischer und morphologischer Untersuchungen weiter unterteilt in die akute myeloische (myeloblastische) oder akute lymphatische (lymphoblastische) Leukämie bzw. in die chronisch-myeloische oder chronisch-lymphatische Leukämie (Tab. 1).

Akute Leukämien:

- Akute myeloische Leukämie (AML): M₀ – M₇
- Akute lymphatische Leukämie (ALL): L₁, L₂, L₃, B-Vorläufer-ALL, B-ALL, T-ALL

Chronische Leukämien:

- Chronisch-myeloische (granulozytäre) Leukämie (CML/CGL)
 - Chronisch-myeloische Leukämie, Ph-positiv (CML, Ph+)
 - Chronisch-myeloische Leukämie, Ph-negativ (CML, Ph-)
 - Juvenile chronisch-myeloische Leukämie
 - Chronisch-neutrophile Leukämie
 - Eosinophile Leukämie
 - Chronisch-myelomonozytäre Leukämie (CMML)
 - Chronisch-lymphatische Leukämie (CLL)
 - B-Zell-Leukämien
 - T-Zell-Leukämien
 - Andere chronische Leukämien, z. B. Haarzell-Leukämie, prolymphozytäre Leukämie, Lymphom/Leukämie-Syndrome
-

Tab. 1: Klassifikation der Leukämien. [Nach: Hoffbrand et al., 1997]

Die weitere Unterteilung der akuten Leukämien erfolgt nach den Vorschlägen der "French-American-British (FAB) Cooperative Group", wobei der Befund aus der Knochenmarkaspiration als Grundlage für diese Unterteilung dient. Die AML wird in acht Untergruppen (M₀ – M₇) eingeteilt, bei der ALL existieren die Untergruppen L₁, L₂ und L₃ (Tab. 2).

| AML | ALL |
|---|---|
| M ₀ undifferenziert | L ₁ Blastenzellen klein, uniform, hohes Verhältnis von Kern zu Zytoplasma |
| M ₁ ohne Reifung | |
| M ₂ mit Granulozytenreifung | L ₂ Blastenzellen größer, heterogen, niedriges Verhältnis von Kern zu Zytoplasma |
| M ₃ akut promyelozytär | L ₃ vakuolisierte Blasten, basophiles Zytoplasma, (gewöhnlich B-ALL) |
| M ₄ Granulozyten- und Monozytenreifung | |
| M ₅ monoblastisch oder monozytär | |
| M ₆ Erythroleukämie | |
| M ₇ megakaryoblastisch | |

Tab. 2: Einteilung der akuten Leukämien nach den Vorschlägen der French-American-British Cooperative Group (FAB). [Nach: Hoffbrand et al., 1997]

In den meisten Fällen ist die Unterscheidung von AML und ALL anhand des klinischen Bildes und der Morphologie der Blastenzellen nach Routinefärbungen möglich. In einigen Fällen ist es jedoch erforderlich, Spezialuntersuchungen durchzuführen, wozu zytochemische, zytogenetische und immunologische Methoden herangezogen werden. So sind im Gegensatz zu ALL-Zellen die Blasten bei der AML positiv für Myeloperoxidase und unspezifische Esterase. Weitere wichtige Befunde stammen aus der Immunologie: Findet man Blasten, die CD 13 und CD 33, Glykophorin (M₆) oder Thrombozytenantigen (M₇) exprimieren, so handelt es sich um Zellen der myeloischen Linie [Hoffbrand et al., 1997]. Dagegen weisen die Blasten der ALL in der Regel keine Differenzierungsmerkmale auf. Ausnahme bildet nur die B-ALL, bei der die Blasten die für B-Zellen charakteristischen Oberflächenantigene CD19, cCD22 und CD10 exprimieren.

1.2.2 Pathogenese akuter Leukämien

Man geht davon aus, daß die leukämische Zellpopulation bei der ALL und der AML durch klonale Proliferation aus einer einzigen abnormen Stamm- oder Vorläuferzelle entsteht. Die Blasten sind nicht mehr zur normalen Differenzierung in der Lage, können sich aber weiterhin teilen. Die starke Zunahme an Myeloblasten (bei der AML) bzw. Lymphoblasten (bei der ALL) führt schließlich zur Verdrängung der normalen hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks bis hin zur Knochenmarkinsuffizienz. Dieser Zustand stellt sich ein, wenn sich die Zahl der Blasten

10^{12} nähert; der Patient ist dann klinisch schwer krank. Liegt der Anteil der leukämischen Zellen bei über 60 % der gesamten Knochenmarkzellen, kommt es meist zu einem Übertritt von Leukämiezellen in das periphere Blut und zur Infiltration anderer Organe.

1.2.3 Häufigkeit akuter Leukämien

Im Vergleich zu anderen Krebsarten sind Leukämien eher selten. In Deutschland erkranken pro Jahr etwa 9.000 Menschen an einer Leukämie, wobei über zwei Drittel der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose über 60 Jahre alt sind [<http://www.krebsinformation.de>]. Etwa die Hälfte aller Leukämien im klinischen Alltag sind akute Leukämien. Die ALL tritt besonders häufig bei Kindern im 3. – 4. Lebensjahr auf. Jenseits des 10. Lebensjahres ist die Inzidenz niedrig, erreicht jedoch nach dem 50. Lebensjahr einen zweiten Gipfel. Im Gegensatz dazu ist die AML eine Erkrankung aller Altersgruppen. Sie ist die häufigste Leukämieform des Erwachsenenalters und der des älteren Menschen; unter den Leukämien des Kindesalters macht sie einen Anteil von 10 – 15 % aus.

1.2.4 Therapie der akuten myeloischen Leukämie

Patienten mit akuter myeloischer Leukämie bedürfen sofortiger intensiver Therapie und müssen sich einer Chemotherapie unterziehen. Bei den dafür eingesetzten Medikamenten handelt es sich um Zytostatika, deren Wirkungsmechanismus meist auf einer Hemmung des Zellwachstums beruht. Das Ziel dieser zytotoxischen Behandlung ist zunächst die Induktion einer Remission, d. h. eine komplette Krankheitsrückbildung, so daß weder im Knochenmark noch im Blut Leukämiezellen nachweisbar sind. Die Induktionstherapie (Einleitungstherapie) besteht aus ein bis zwei Kursen intensiver Chemotherapie, wobei zunächst eine Kombination von mindestens drei Medikamenten eingesetzt wird, um die zytotoxische Wirkung zu verstärken und die Remissionsraten zu verbessern. Danach erfolgen eine ebenso intensive Konsolidierungstherapie (Festigungstherapie) und eine Erhaltungstherapie, die mindestens über ein Jahr andauert und zur Stabilisierung des Behandlungserfolgs dient. Da die in der AML-Therapie verabreichten myelotoxischen Medikamente nur sehr unspezifisch auf leukämische Zellen wirken, werden auch sehr viele normale Knochenmarkzellen geschädigt. Deshalb ist die Knochenmarkinsuffizienz infolge einer AML-Therapie

gravierend und lang anhaltend und eine intensive Supportivtherapie unerlässlich. Besonders bei Patienten über 60 Jahren kommt es häufig zu Fröhrtodesfällen durch Infektionen, Blutungen oder Versagen von Herz, Nieren oder anderen Organen. [Hoffbrand et al., 1997]. Etwa die Hälfte dieser Patienten kommt nach der Chemotherapie in eine Remission; bei Patienten unter 60 Jahren liegt die Remissionsrate deutlich höher, nämlich bei 70 – 80 %, wovon 20 – 30 % krankheitsfrei überleben.

Erleidet der Patient nach erfolgter Behandlung einen Rückfall (Rezidiv) oder konnte die Erkrankung schon bei der ersten Therapie nicht vollständig zur Rückbildung gebracht werden, so muß er sich einer weiteren sehr intensiven Chemotherapie unterziehen. Häufig wird dann auch eine Ganzkörperbestrahlung durchgeführt, die das Ziel hat, das Knochenmark als Ursprungsstätte der Erkrankung und damit auch alle Leukämiezellen komplett zu zerstören. Im Anschluß daran muß allerdings eine Knochenmarktransplantation (KMT) zur Wiederherstellung des blutbildenden Systems des Patienten durchgeführt werden. Bei der allogenen KMT erhält der Patient Blutstammzellen von einem HLA- und MLC-kompatiblen Spender (z. B. Geschwister). Damit die transplantierten Zellen nicht vom Empfänger abgestoßen werden, wird das Immunsystem recht unspezifisch, aber hocheffizient supprimiert. Mittlerweile gibt es auch Hinweise darauf, daß das Transplantat selbst zur weiteren Reduzierung des Rezidivrisikos beiträgt ("Graft-versus-leukemia-effect", GvL), indem sich die mitübertragenen Immunzellen des Spenders gegen die Leukämiezellen richten. Bei Patienten ohne passenden Spender ist alternativ auch eine autologe Blutstammzelltransplantation möglich. Dazu wird ihm in der ersten Remission Knochenmark entnommen, das mit Hilfe von Medikamenten oder Antikörpern von darin enthaltenen Leukämiezellen gereinigt wird ("purging"). Nachteile hierbei sind zum einen das Ausbleiben der Transplantat-gegen-Leukämie-Wirkung, zum anderen ist nicht auszuschließen, daß in dem Eigentransplantat vorhandene einzelne Leukämiezellen enthalten sind, die später einen Rückfall auslösen können.

1.3 Molekulare Mechanismen in der Entstehung akuter Leukämien

Im hämatopoetischen System durchlaufen Stammzellen einen Prozeß, in dem sie sich zu multipotenten Vorläuferzellen entwickeln, aus denen wiederum alle Arten von reifen Blutzellen entstehen. Wird das diesem Prozeß zugrunde liegende Gleichgewicht

gestört, kommt es zu einer Ansammlung abnormaler hämatopoetischer Zellen und schließlich zu einer Leukämie. Eine Störung des Gleichgewichts stellt sich ein, wenn die Differenzierung in eine bestimmte hämatopoetische Linie blockiert ist oder Kontrollmechanismen des programmierten Zelltods (Apoptose) versagen. Im Gegensatz zu soliden Tumoren sind Leukämien sehr häufig (etwa 65 % aller akuten Leukämien) mit bestimmten chromosomalen Translokationen assoziiert [Look, 1997], die zu einer gesteigerten oder fehlerhaften Transkription von Genen, zur Entstehung von Fusionsgenen oder aber einer Kombination aus beidem führen können. Betroffen sind dabei meist Gene, die eine entscheidende Rolle in der Zelldifferenzierung, Zellproliferation oder Apoptose spielen [Lutterbach & Hiebert, 2000].

1.3.1 Veränderungen von Transkriptionsfaktoren bei akuten Leukämien

Eine wesentliche Rolle in der Differenzierung hämatopoetischer Zellen spielen Transkriptionsfaktoren [Orkin, 1995; Shivdasani & Orkin, 1996]. Diese Gene sind bei akuten Leukämien am häufigsten von chromosomalen Translokationen betroffen. Begünstigt wird dies durch den "modulartigen" Aufbau der Transkriptionsfaktoren, die über verschiedene Domänen mit unterschiedlichen Funktionen (DNA-bindende Domänen, Dimerisierungs- und Transaktivierungsdomänen) verfügen. Durch Rekombination von DNA-Sequenzen, die normalerweise auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind und bestimmte Domänen eines Transkriptionsfaktors kodieren, kommt es zur Entstehung chimärer Gene, die dann Fusionsproteine mit veränderter Funktion kodieren und damit zu einer Fehlregulation des Transkriptionsfaktors führen. Dieses Phänomen findet man häufig bei Transkriptionsfaktor-Translokationen, die mit der Entwicklung von akuten Leukämien in Verbindung stehen. Als Beispiele hierfür sind die Fusionsproteine AML1-ETO {t(8;21)}, TEL-AML1 {t(12;21)}, CBF β -MYH11 {inv(16)}, PML-RAR α {t(15;17)} und PLZF-RAR α {t(11;17)} zu nennen. Dabei fällt auf, daß die verschiedenen Translokationen zu sehr charakteristischen Phänotypen führen, nämlich zu einer Blockade in einem bestimmten Differenzierungsstatus. So findet man z. B. das Fusionsprotein AML1-ETO ausschließlich in Myeloblasten, während Translokationen, die das RAR α -Gen auf Chromosom 17 betreffen, nur in promyelozytären Vorläuferzellen auftreten [Look, 1997]. In den genannten Fällen stören die dysregulierten und/oder strukturell veränderten Transkriptionsfaktoren Prozesse, die für die weitere normale Entwicklung dieser speziellen Zelllinien wichtig wären. Insbesondere bei akuten myeloischen

Leukämien können als Resultat von Translokationen Gene in unreifen Stammzellen aktiviert werden, die noch das Potential zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in verschiedene Zelllinien besitzen [Bonnet & Dick, 1997].

In lymphoiden Progenitorzellen der T- oder B-Linien findet man häufig Translokationen, die bewirken, daß ein Transkriptionsfaktor-Gen in die unmittelbare Nähe eines T-Zell-Rezeptor- (TCR) bzw. Immunglobulin- (Ig) Gens gerät. In diesen Fällen sind die kodierten Proteine strukturell nicht verändert. Die onkogene Wirkung beruht darauf, daß die Transkription unter dem Einfluß fremder regulatorischer Sequenzen dysreguliert ist. Beispiele hierfür sind bei der T-Zell-Leukämie die Translokationen 7q35/TCR β und 14q11/TCR $\alpha\delta$. Beim Burkitt-Lymphom (B-Zell-Leukämie) findet man die Translokationen t(8;14), t(2;8) und t(8;22), an denen das MYC-Gen beteiligt ist [Look, 1997].

1.3.2 Funktion des Transkriptionsfaktors AML1 während der hämatopoetischen Differenzierung und in der akuten myeloischen Leukämie

1.3.2.1 Der AML1/CBF β -Transkriptionsfaktor-Komplex in der Hämatopoese

Der Transkriptionsfaktor AML1 (Acute Myeloid Leukemia 1) gehört zur Familie der "Core Binding Factors" (CBF), die auch als "Polyoma Enhancer Binding Protein 2" (PEBP2) bezeichnet werden. Deshalb werden die Maus-Homologen von AML1 auch als CBFA2 oder PEBP2 α B bezeichnet. Zur AML-Familie gehören auch AML2 (CBFA3 oder PEBP2 α C) und AML3 (CBFA1 oder PEBP2 α A) [Levanon et al., 1994], deren Rolle innerhalb der myeloischen Entwicklung aber unklar ist. Von AML1 existieren die drei Isoformen AML1a, AML1b und AML1c, wobei sich die beiden längeren Isoformen AML1b und AML1c durch die Anwesenheit von 27 zusätzlichen Aminosäuren am Amino-Terminus von AML1c unterscheiden (Abb. 2) [Tanaka et al., 1995; Takahashi et al., 1995; Miyoshi et al., 1995; Meyers et al., 1995]. Wenn im folgenden von AML1 gesprochen wird, so ist, falls nicht anders vermerkt, die AML1b-Isoform gemeint.

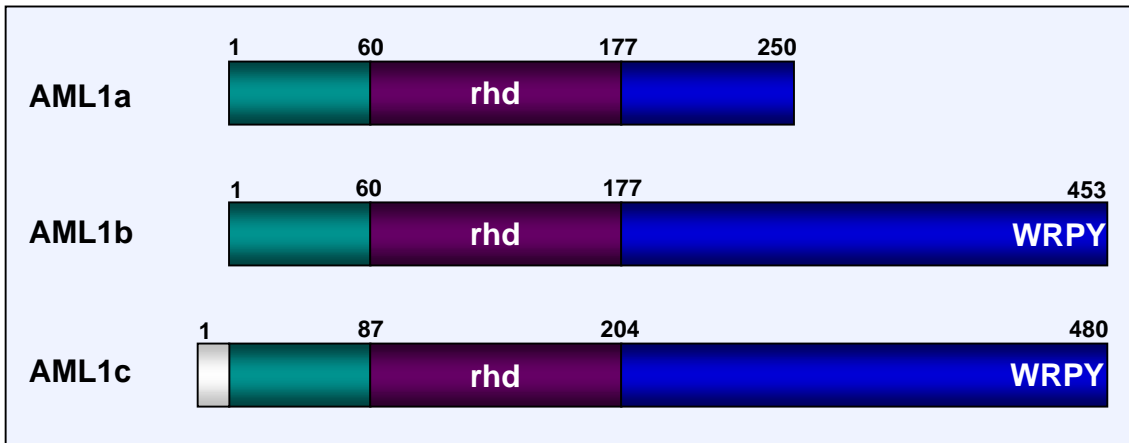


Abb. 2: Schematische Darstellung der AML1-Isoformen. Rhd bezeichnet die Runt-Homologie-Domäne, WRPY das Groucho-Bindungsmotiv. Die Zahlen stehen für Aminosäuren. Weitere Erläuterungen folgen im Text. [Nach: Lutterbach & Hiebert, 2000]

CBF-Proteine bestehen als Heterodimere aus einer α - und einer β -Untereinheit. Die DNA-Bindung erfolgt über die α -Untereinheit; die β -Untereinheit bindet nicht direkt an DNA, verstärkt aber die Bindung der α -Untereinheit [Wang et al., 1993; Ogawa et al., 1993]. Sowohl die DNA-Bindung also auch die Heterodimerisierung mit dem Cofaktor CBF β erfolgen über die *Runt*-Domäne (rhd), die Bestandteil aller AML1-Proteine ist [Kamachi et al., 1990, Meyers et al., 1993; Lenny et al., 1995]. Bei der *Runt*-Domäne handelt es sich um eine S-Typ-Immunglobulin-Faltung, die den DNA-Bindungsdomänen von p53, NF-KB, NFAT-1 und der STAT-Proteine ähnelt [Nagata et al., 1999]. Ihren Namen hat diese Region aufgrund ihrer großen Homologie zum Drosophila-Gen "Runt", einem Paarregel-Gen, das während der frühen Drosophila-Entwicklung die Expression anderer Segmentierungsgene steuert [Kania et al., 1990; Kagoshima et al., 1993].

AML1 wird vor allem während der myeloischen Differenzierung in hämatopoetischen Geweben exprimiert [Miyoshi et al., 1995; Tanaka et al., 1995; Cheng et al., 1996]. Zudem findet man das Protein in Nervengewebe, Skelettmuskeln und Fortpflanzungsorganen [Zhu et al., 1994]. Studien mit AML1 homozygot negativen Mäusen (AML1-"Knock-out"-Mäusen) haben bestätigt, daß dieses Protein in der Hämatopoese eine entscheidende regulatorische Rolle spielt und für eine normale hämatopoetische Entwicklung essentiell ist. AML1^{-/-}-Mausembryonen verfügten über eine normale Morphogenese und eine primitive Dottersack-Erythropoese. Die Blutbildung in der fötalen Leber ist jedoch so stark gestört, daß die Tiere während des mittleren Embryonalstadiums (Tag E12.5) an Blutungen im Gehirn, Pericard und

Peritoneum sterben [Okuda et al., 1996; Wang et al., 1996]. Darüber hinaus sind AML1^{-/-}- embryonale Stammzellen nicht dazu in der Lage, zur Blutbildung in AML1 heterozygoten Mäusen beizutragen, und die Anzahl an myeloischen und erythroiden Vorläuferzellen ist in diesen Tieren vermindert [Okuda et al., 1996; Wang et al., 1996a]. Ebenfalls von entscheidender Bedeutung für die Funktion von AML1 ist das Vorhandensein seines Cofaktors CBF β . Bei CBF β ^{-/-}-Mäusen fand man die selben Abnormalitäten (massive Störung der fötalen Leberhämatopoese, Blutungen des zentralen Nervensystems, embryonale Letalität) wie bei AML1 negativen Tieren [Sasaki et al., 1996; Wang et al., 1996b; Niki et al., 1997]. Die ähnlichen Phänotypen verdeutlichen, daß beide Bestandteile des AML1/CBF β -Transkriptionsfaktor-Komplexes für die Entwicklung einer ungestörten Hämatopoese unbedingt erforderlich sind.

1.3.2.2 AML1 als transkriptioneller Aktivator

Eine Reihe von Promotoren hämatopoetischer Gene werden durch AML1 aktiviert wie z. B. die Promotoren für Interleukin-3 (IL-3) [Uchida et al., 1997], den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktor (GM-CSF) [Hohaus et al., 1995; Takahashi et al., 1995], den Rezeptor für den Kolonie-stimulierenden-Faktor 1 (CSF-1-Rezeptor = M-CSFR) [Zhang et al., 1994], Neutrophile Elastase [Nuchprayoon et al., 1994], Granzym B [Wargnier et al., 1995], Myeloperoxidase [Suzow & Friedman, 1993] und Untereinheiten des T-Zell- und B-Zell-Antigen-Rezeptors (TCR) [Prosser et al., 1992; Redondo et al., 1992; Wang et al., 1993; Erman et al., 1998]. Desweiteren vermutet man, daß AML1 als "zentraler Faktor" agiert, indem er die Bildung eines Transkriptionsaktivator-Komplexes fördert [Lutterbach & Hierbert, 2000]. So befinden sich AML1-Bindungsstellen häufig in der Nähe von Bindungsstellen anderer, in der Hämatopoese wichtiger Transkriptionsfaktoren wie z. B. Myb, Ets, PU.1, AP-1 und C/EBP, mit denen AML1 bei der Transkriptionsaktivierung kooperiert [Hernandez-Munain & Krangel, 1994; Frank et al., 1995; Sun et al., 1995; Petrovick et al., 1998; Westendorf et al., 1998; Mao et al., 1999]. Als Beispiel für eine solche Kooperation sei die Aktivierung des Promotors für den Rezeptor des Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktors (M-CSFR) genannt. In diesem Promotor liegt die AML1-Bindungsstelle zwischen den Bindungsstellen für C/EBP α und PU.1, zwei Faktoren, die für die Expression myeloischer Gene wichtig sind (Abb. 3) [Zhang et al., 1994; Zhang et al., 1996].

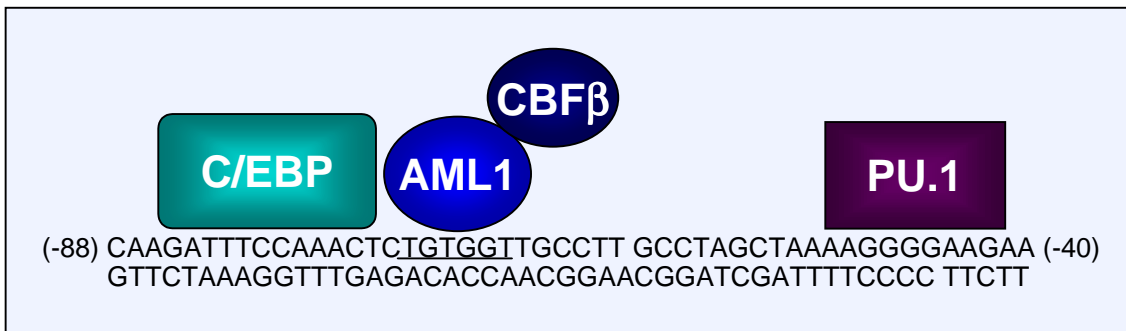


Abb. 3: Darstellung des humanen M-CSF-Promotors. Seine Spezifität ergibt sich aus der kooperativen Aktivität der gezeigten Faktoren. Daten aus transienten Transfektionsexperimenten zeigen eine ~60fache Aktivierung des Promotors durch synergistische Wirkung von AML1/CBF β und C/EBP α im Vergleich zu einer ~6fachen Aktivierung durch AML1/CBF β allein. [Nach: Tenen et al., 1997]

Wichtig im Zusammenhang mit seiner Funktion als Transkriptionsaktivator ist auch die Tatsache, daß AML1 mit Coaktivator-Proteinen wie p300/CBP (CBP = CREB-binding protein) interagieren kann [Kitabayashi et al., 1998b]. Eine Deletionsanalyse von AML1 ergab, daß die Aminosäuren 320 – 356 für eine Bindung mit p300/CBP erforderlich sind. Das bedeutet, daß die p300/CBP-Bindungsstelle in der Transaktivierungsdomäne von AML1 lokalisiert ist. Es ist aber nicht auszuschließen, daß p300/CBP an mehreren Stellen Kontakt zu AML1 hat.

1.3.2.3 AML1 als transkriptioneller Repressor

Die Rolle von AML1 als transkriptioneller Repressor ist nicht so gut dokumentiert wie seine Rolle als Aktivator. Am carboxy-terminalen Ende von AML1 befindet sich ein WRPY-Motiv, das dem im *Drosophila*-Protein "hairy" ähnelt. Dort ist dieses Motiv für Interaktionen mit Groucho-Corepressoren erforderlich [Fisher et al., 1996]. Für AML1 wurde eine Interaktion mit einem Säuger-Homolog von Groucho, TLE1 ("transducin-like enhancer of split-1"), nachgewiesen. Diese Interaktion führte in transienten Transfektionsexperimenten zu einer transkriptionellen Repression durch GAL4-AML1 auf einem heterologen Promotor [Aronson et al., 1997]. Eine weitere Gruppe von Corepressoren, für die eine Interaktion mit AML1 nachgewiesen wurde, sind die Sin3-Proteine. Diese Proteine agieren als Corepressoren, indem sie direkt auf die basale Transkriptionsmaschinerie einwirken [Muscat et al., 1998; Wong & Privalsky, 1998] und Histon-Deacetylasen zu Transkriptionsfaktoren rekrutieren [Torchia et al., 1998]. Durch Deletionsanalyse wurde die mSin3A-Bindungsstelle in die Region der Aminosäuren 208 – 237 in AML1c kartiert [Lutterbach et al., 2000]. In Abb. 4 sind alle genannten

Protein-Bindungspartner von AML1b und AML1c (am Beispiel von AML1c) zusammenfassend dargestellt:

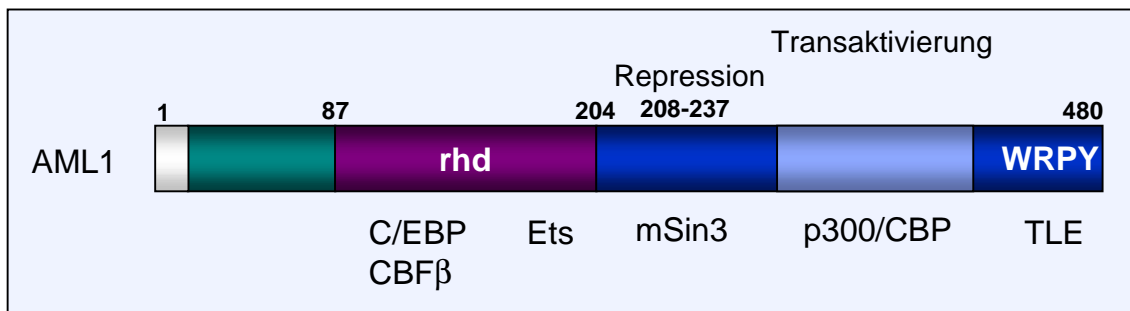


Abb. 4: Schematische Darstellung der Interaktionspartner von AML1c und der Regionen im Protein, die Transaktivierung bzw. Repression vermitteln. [Nach Lutterbach et al., 2000]

Wenn AML1 Transkription sowohl aktivieren als auch reprimieren kann, drängt sich die Frage auf, welcher Mechanismus diesem Phänomen zugrunde liegt. Ein Hinweis dazu könnten die Ergebnisse aus Transfektionsexperimenten mit dem AML1-abhängigen p21^{WAF-1}-Promotor sein, die ergaben, daß AML1 in NIH3T3- und HEL-Zellen transkriptionelle Repression vermittelt, in anderen Zelllinien dagegen zu einer Transkriptionsaktivierung führt [Lutterbach & Hiebert, 2000]. Es sieht danach aus, als ob AML1 in bestimmten Zelltypen (vor allem hämatopoetischen Zellen) mit Faktoren wie p300/CBP interagiert, um Transkription zu stimulieren; der Verlust dieser Bindung und nachfolgende Interaktionen mit Sin3- oder Groucho-Proteinen hingegen könnten aus dem Aktivator einen Repressor machen (Abb. 5). Welche Signalwege an diesem Prozeß beteiligt sind, muß jedoch noch untersucht werden.

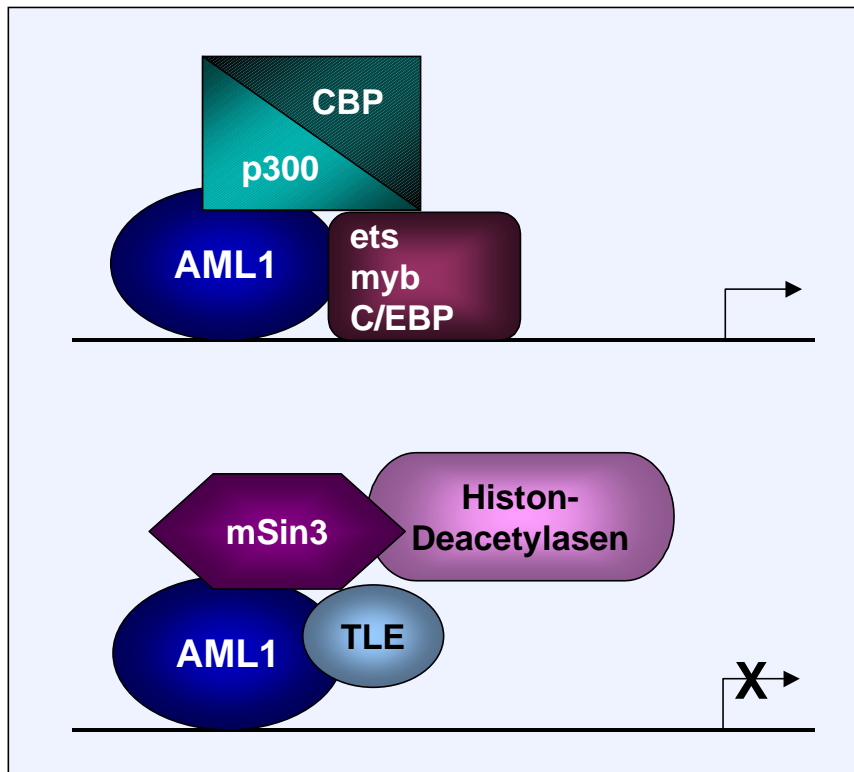


Abb. 5: Möglicher Mechanismus, wie der Aktivator AML1 zu einem Repressor werden könnte. Der obere Teil der Abbildung zeigt AML1 als Transkriptionsaktivator; AML1 interagiert mit anderen Transkriptionsfaktoren wie z. B. Ets, Myb oder C/EBP sowie mit Coaktivatoren wie p300/CBP. Im unteren Teil der Abbildung ist AML1 als Repressor dargestellt; dabei interagiert AML1 mit Corepressoren wie mSin3- und/oder Groucho-Proteinen. Dies könnte Histondeacetylaseaktivität mit in den Komplex bringen. [Nach: Lutterbach & Hiebert, 2000]

1.3.2.4 Bedeutung von AML1 in der Leukämieentstehung

AML1 wurde erstmals identifiziert, als man eine der häufigsten chromosomalen Translokationen in der akuten myeloischen Leukämie, die Translokation t(8;21) (q22;q22), untersuchte, bei der es zur Fusion der Gene AML1 und ETO ("Eight-Twenty-One") kommt [Miyoshi et al., 1991; Erickson et al., 1992; Miyoshi et al., 1993; Nucifora et al., 1995]. Die Translokation ist charakteristisch für die AML-M₂; man findet sie dort bei etwa 40 % der Patienten. Innerhalb der gesamten akuten myeloischen Leukämien nimmt sie einen Anteil von 12 % ein. Der Cofaktor von AML1, CBF β , ist ohnehin häufig von chromosomalen Rearrangements betroffen. Durch die Inversion inv(16) (p13;q22) entsteht das Fusionsgen CBF β -MYH11, das man ebenfalls bei 12 % der Patienten mit AML findet – allerdings bei Patienten mit AML-M₄. [Liu et al., 1993]. Der AML1/CBF β -Transkriptionsfaktor-Komplex ist somit der am häufigsten von chromosomalen Translokationen betroffene Proteinkomplex (Abb. 6). Aber nicht nur

innerhalb der akuten myeloischen, sondern auch in der akuten lymphatischen Leukämie findet man Translokationen, an denen AML1 beteiligt ist. Als Beispiel hierfür sei das Fusionsgen TEL-AML1 genannt, das durch die Translokation t(12;21) entsteht und bei 20 % der Patienten mit ALL zu finden ist [Paslier et al., 1995].

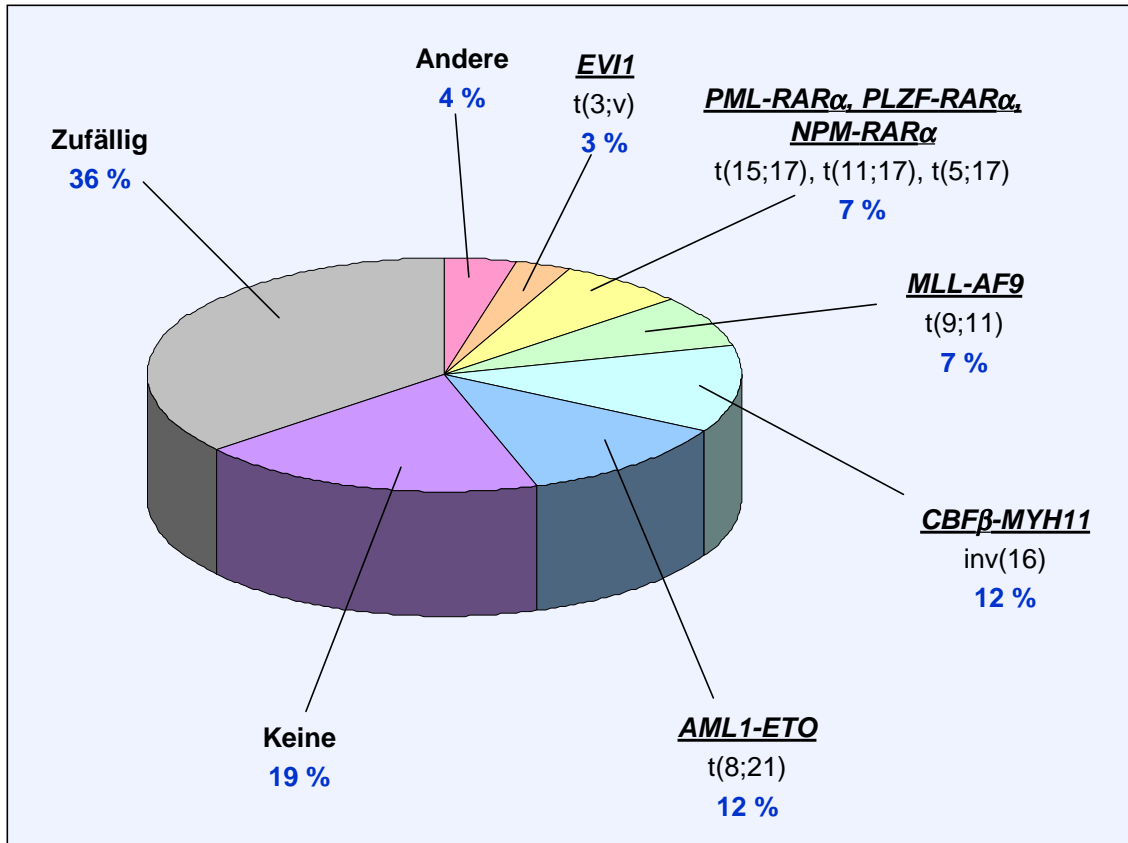


Abb. 6: Relative Häufigkeit von Genen, die bei verschiedenen morphologischen Subtypen akuter myeloischer Leukämien des Kindes und jungen Erwachsenen rearrangiert werden. Zufällige Rearrangements wurden bisher jeweils nur bei singulären Fällen beschrieben. Obwohl sowohl AML1-ETO als auch CBFβ-MYH11 den AML1-CBFβ-Komplex betreffen, scheinen sie die Hämatopoese durch unterschiedliche Mechanismen zu stören, denn sie sind mit unterschiedlichen morphologischen Subtypen der AML assoziiert (FAB M₂ bzw. M₄). [Nach: Look, 1997]

Wie bereits oben erwähnt, resultiert die Translokation t(8;21) in der Entstehung des Fusionsgens AML1-ETO. Dieses verfügt über den 5'-Anteil von AML1, der die "Runt"-Domäne beinhaltet und das fast komplette ETO-Gen (die carboxy-terminalen 575 von insgesamt 604 Aminosäuren) (Abb. 7). Die Fusion der beiden Sequenzen erfolgt im selben Leserahmen, so daß ein Protein von 752 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ~ 83 kDa entsteht.

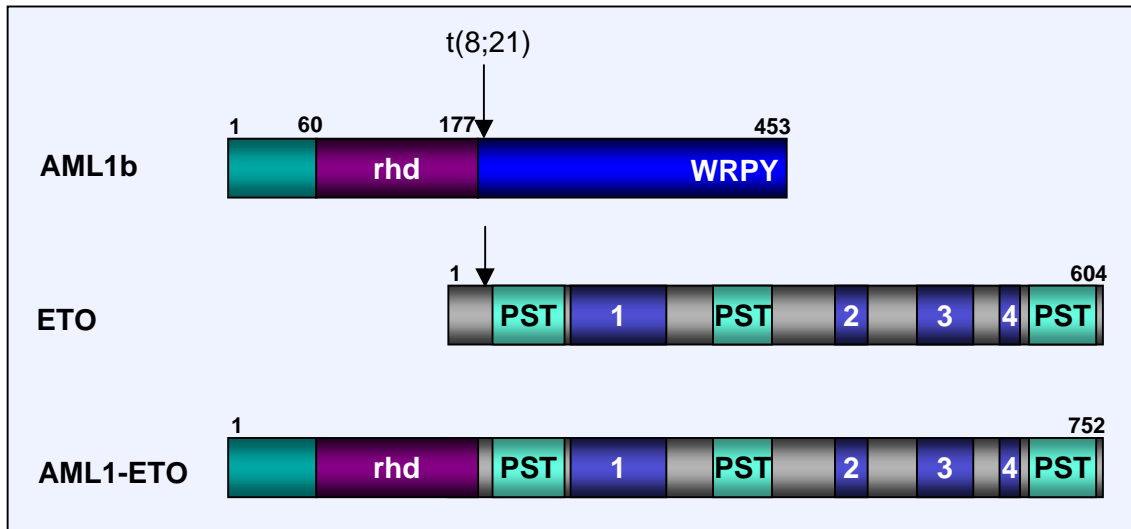


Abb. 7: Schematische Darstellung der Gene AML1b, ETO und dem aus der Translokation t(8;21) resultierenden Fusionsgen AML1-ETO. Die Pfeile markieren den Translokationsbruchpunkt, der im AML1-Gen unmittelbar nach dem letzten für die rhd-Domäne codierenden Exon liegt. Im ETO-Gen befindet sich die Bruchstelle sehr weit am 5'-Ende, so daß das resultierende Fusionsgen fast die komplette ETO-Sequenz beinhaltet. PST steht für Prolin/Serin/Threonin-reiche Region; die Zahlen 1 – 4 kennzeichnen die NHR-Domänen 1 – 4 (weitere Erläuterungen folgen im Text). [Nach: Nucifora & Rowley, 1995 und Kitabayashi et al., 1998]

ETO wurde ebenfalls zum ersten Mal aufgrund seiner Beteiligung an der Translokation t(8;21) identifiziert [Miyoshi et al., 1991]. In der Literatur wird es auch als MTG8 (Myeloid Transforming Gene 8) bezeichnet. Bei ETO handelt es sich um ein nukleares Phosphoprotein, das überwiegend im Gehirn exprimiert wird [Erickson et al., 1996]. Mittlerweile wurden zusätzliche Proteine gefunden, die auch zur ETO-Familie gezählt werden. So umfaßt diese Familie nun drei humane Proteine (ETO, MTGR1 und MTG16), zwei Maus-Proteine (mETO und ETO-2) sowie das *Drosophila*-Homolog "Nervy" [Feinstein et al., 1995; Niwa-Kawakita et al., 1995; Gamou et al., 1998; Calabi & Cilli, 1998; Kitabayashi et al., 1998; Davis et al., 1999]. Über die Funktionen der verschiedenen Mitglieder der ETO-Familie ist bis jetzt nicht viel bekannt. Die Überexpression von ETO führt in NIH3T3-Zellen zur Transformation der Zellen [Wang et al., 1997]. Für Nervy vermutet man eine Rolle in der Neuroblasten-Determination, denn es wird in den frühen Stadien der Neurogenese in einem Teil der Neuroblasten exprimiert [Abu-Shaar et al., 1995]. Besonders in vier Regionen, den sog. Nervy-Homologie-Regionen (NHR), verfügt ETO über große Homologien (zwischen 48 und 71 %) mit dem *Drosophila*-Protein. Die Region NHR1 verfügt zusätzlich über Homologien zu den transkriptionellen Coaktivator-Proteinen hTAF 130 (TBP-associated factor 130), hTAF 105 und *Drosophila* TAF 130 [Hoey et al., 1993; Dikstein

et al., 1996; Tanese et al., 1996; Kitabayashi et al., 1998]. Bei der Region NHR2 handelt es sich um eine amphipathische Helix, die für die Bildung von ETO/ETO-Homodimeren sowie ETO/MTGR1- und AML1-ETO/ETO-Heterodimeren erforderlich ist [Lutterbach et al., 1998a; Kitabayashi et al., 1998a]. Über die NHR3-Domäne ist noch nicht viel bekannt. Man vermutet jedoch, daß es sich auch hier um eine Region mit helikaler Struktur handelt [Kitabayashi et al., 1998a]. Die Region in ETO, die die größte Homologie zu *Nervy* aufweist, ist die NHR4, die auch als MYND-Motiv (“Myeloid, Nervy, and DEAF-1“) bezeichnet wird. In dieser Region befinden sich zwei Zinkfinger-Motive [Kitabayashi et al., 1998a]. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die MYND-Region für die Interaktion mit dem nukleären Rezeptor Corepressor N-CoR essentiell ist [Gelmetti et al., 1998; Lutterbach et al., 1998b; Wang et al., 1998]. Obwohl es sich bei Zinkfinger-Motiven häufig um DNA-bindende Domänen handelt, konnte für ETO bisher keine DNA-Bindungsaktivität nachgewiesen werden. Aufgrund dieser strukturellen Eigenschaften und ihrer Lokalisation im Zellkern vermutet man aber, daß es sich bei ETO und MTGR1 um transkriptionelle Regulatoren handelt.

1.3.2.5 AML1 und AML1-ETO: Vom Transaktivator zum Corepressor

Wie bereits oben erläutert, handelt es sich bei AML1 um einen Transkriptionsfaktor, der für die Entwicklung einer normalen Hämatopoese essentiell ist. Dabei agiert AML1 in den meisten Fällen als transkriptioneller Aktivator. Es sind auch ein paar Beispiele bekannt, bei denen AML1 eine reprimierende Wirkung aufweist. Man kennt zwar noch nicht die Signalwege, die dafür ausschlaggebend sind, ob AML1 als Aktivator oder Repressor agiert, vermutet aber, daß dabei der jeweilige Zelltyp eine Rolle spielt. Für die Vorgänge, die während einer normalen Hämatopoese stattfinden, sind aber auf jeden Fall die transaktivierenden Fähigkeiten von AML1 unbedingt erforderlich.

In etwa 40 % der Patienten mit AML-M₂ findet man in den leukämischen Blasten das Fusionsgen AML1-ETO, das aus der Translokation t(8;21) resultiert. Man vermutet daher, daß dieses Translokationsprodukt für die in den Blasten existierende Differenzierungsblockade und damit zur Entstehung dieser Leukämieform mitverantwortlich ist. Es gibt zahlreiche Beispiele, die belegen, daß AML1-ETO die AML1-vermittelte Transaktivierung verhindert. Betroffen sind dabei vor allem Gene, die eine Schlüsselrolle in der myeloischen Differenzierung spielen wie z. B. der TCRβ-Enhancer, IL-3 und GM-CSF [Meyers et al., 1995; Frank et al., 1995; Uchida et al., 1997]. Darüber hinaus gibt es Daten, die zeigen, daß erhöhte Expression von AML1-

ETO in myeloischen Vorläuferzellen zu einer Differenzierungsblockade führt [Kitabayashi et al., 1998b; Westendorf et al., 1998].

Um die biologische Funktion von AML1-ETO *in vivo* zu demonstrieren, wurden verschiedene Maus-Modelle etabliert. Z. B. wurden transgene Mäuse generiert, die heterozygot für AML1-ETO waren (AML1-ETO-“Knock-in“-Mäuse) und bei denen das Fusionsgen unter der Kontrolle des AML1-Promotors stand. Die AML1-ETO^{+/-}-Embryonen waren nicht lebensfähig und starben im mittleren Embryonalstadium um Tag E13 [Yergeau et al., 1997; Okuda et al., 1998]. Ihr Phänotyp ähnelte sehr stark dem der AML1^{-/-}-Mäuse, bei denen die fötale Leberhämatopoese gestört war und Blutungen im ZNS auftraten. Im Gegensatz zu den AML1^{-/-}-Mäusen verfügten die AML1-ETO^{+/-}-Mäuse jedoch über einige wenige hämatopoetische Progenitorzellen. Die Anwesenheit dieser Vorläuferzellen war möglicherweise auf eine unvollständige Inhibierung der AML1-Zielgene durch AML1-ETO zurückzuführen, so daß eine schwache Expression dieser Gene zu einer stark verminderten Blutbildung führte. Da die “Knock-in“-Modelle zu embryonaler Lethalität führten, eigneten sie sich nicht, um die Rolle von AML1-ETO in der Leukämieentstehung zu untersuchen. Hierfür würde man ein Modell benötigen, bei dem die Expression des Fusionsgens konditionell während der Embryogenese verhindert und erst in einem späteren Stadium der Entwicklung angeschaltet werden würde. Denn bei der in Patienten vorkommenden Translokation t(8;21) handelt es sich um eine somatisch erworbene Mutation, die während der Embryonalentwicklung noch gar nicht vorhanden ist. Die Untersuchung der in den transgenen Embryonen vorhandenen Vorläuferzellen ergab, daß diese *in vitro* ein gestörtes Proliferationsverhalten aufwiesen [Okuda et al., 1998]. Dasselbe Verhalten zeigten auch Knochenmarkzellen, die retroviral mit AML1-ETO transduziert wurden. Die Zellen hatten ein erhöhtes Selbsterneuerungspotential und konnten *in vitro* immortalisierte Zelllinien bilden [Okuda et al., 1998]. In anderen Modellen wurden sublethal bestrahlte syngene Mäuse bzw. Mäuse mit schwerer kombinierter Immundefizienz (SCID-Mäuse) mit AML1-ETO-exprimierenden Knochenmarkzellen rekonstituiert. Diese Tiere entwickelten allerdings keine Leukämie. Die genannten Daten sprechen dafür, daß AML1-ETO für die Entwicklung einer AML zwar erforderlich, aber allein nicht ausreichend ist. Man vermutet, daß dafür zusätzliche Mutationen auftreten müssen. Um herauszufinden, welche Art von sekundären Mutationen dazu in der Lage wären, müßten jedoch zunächst geeignete Mausmodelle etabliert werden. Das AML1-ETO-“Knock-in“-Modell ist hierfür nicht geeignet, denn es führt - wie oben beschrieben - zu embryonaler Letalität. Mit Hilfe eines Tetracyclin-induzierbaren Systems wurden transgene Mäuse generiert, bei denen die AML1-ETO-Expression

durch Tetracyclin-Entzug induziert werden konnte. Im Gegensatz zu den AML1-ETO-“Knock-in“-Mäusen waren diese Tiere zwar lebensfähig, entwickelten jedoch keine Leukämie. Sie zeigten nach Induktion lediglich eine starke AML1-ETO-Expression im Knochenmark [Rhoades et al., 2000]. Auch dieses Ergebnis spricht dafür, daß AML1-ETO über leukämisches Potential verfügt, die Zellen zur Entfaltung eines leukämischen Phänotyps aber noch zusätzliche Mutationen erlangen müssen. Gestützt wird diese Hypothese auch durch Patienten-Befunde. So kann man bei Patienten, die sich Jahre nach der Behandlung in klinischer Remission befinden, durch RT-PCR oft AML1-ETO-Expression in Knochenmarkzellen nachweisen [Miyamoto et al., 2000]. In einem weiteren Mausmodell wurde die Translokation t(8;21) durch Cre/loxP-vermittelte Rekombination erzeugt. Bis jetzt wurden auch hier keine malignen Phänotypen gefunden [Buchholz et al., 2000]. Zur Zeit gibt es nur ein Mausmodell, bei dem adulte, AML1-ETO-transgene Tiere in Kombination mit anderen Mutationen, eine AML entwickelten [Yuan et al., 2001]. Bei diesem Ansatz steht das AML1-ETO-Gen unter der Kontrolle des humanen MRP8-Promotors. Bei MRP8 handelt es sich um ein kleines Calcium-bindendes Protein, das spezifisch in myeloischen Zellen der neutrophilen und monozytären Linien exprimiert wird [Lagasse & Weissman, 1992]. Deshalb eignet sich der MRP8-Promotor gut dafür, um eine spezifische Expression in myeloischen Zellen zu erreichen und damit das Problem der embryonalen Lethalität zu umgehen. Die hMRP8-AML1-ETO-transgenen Mäuse verfügten über einen normalen Phänotyp und entwickelten zunächst keine Leukämie. Daraufhin wurden sie mit dem stark DNA-alkylierenden Mutagen ENU (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea) behandelt. Dies führte in 55 % der Tiere zur Entstehung einer AML. Die übrigen transgenen Tiere sowie alle Wildtyp-Tiere, die mit ENU behandelt wurden, entwickelten Lymphome oder eine ALL. Zur Entstehung einer AML kam es in dieser Studie also nur durch die Kombination von AML1-ETO mit ENU. Dies könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, daß AML1-ETO erst in Kooperation mit zusätzlichen Mutationen zu einer AML führt. Um welche sekundären Mutationen es sich dabei handelt, weiß man jedoch nicht. Man vermutet aber, daß diese Mutationen das Proliferationsverhalten der Zellen beeinflussen.

Wenn auch in bezug auf die erforderlichen zusätzlichen Mutationen noch Ungewißheit herrscht, so führt man die Differenzierungsblockade in den leukämischen Blasten auf die Expression von AML1-ETO zurück. Aus zahlreichen Experimenten, die sich mit den Protein-Interaktionen des Fusionsproteins beschäftigten, weiß man, daß der ETO-Anteil an Corepressoren bindet. Dazu gehören der “Nukleare Rezeptor Co-Repressor“ (N-CoR) und das Säuger-Sin3-Protein (mSin3) sowie das Enzym Histon-Deacetylase 1

(HDAC1) [Gelmetti et al., 1998; Lutterbach et al., 1998; Wang et al., 1998]. Die Folgen dieser Interaktionen auf die Transkription spezifischer Gene sind in Abb. 8 dargestellt.

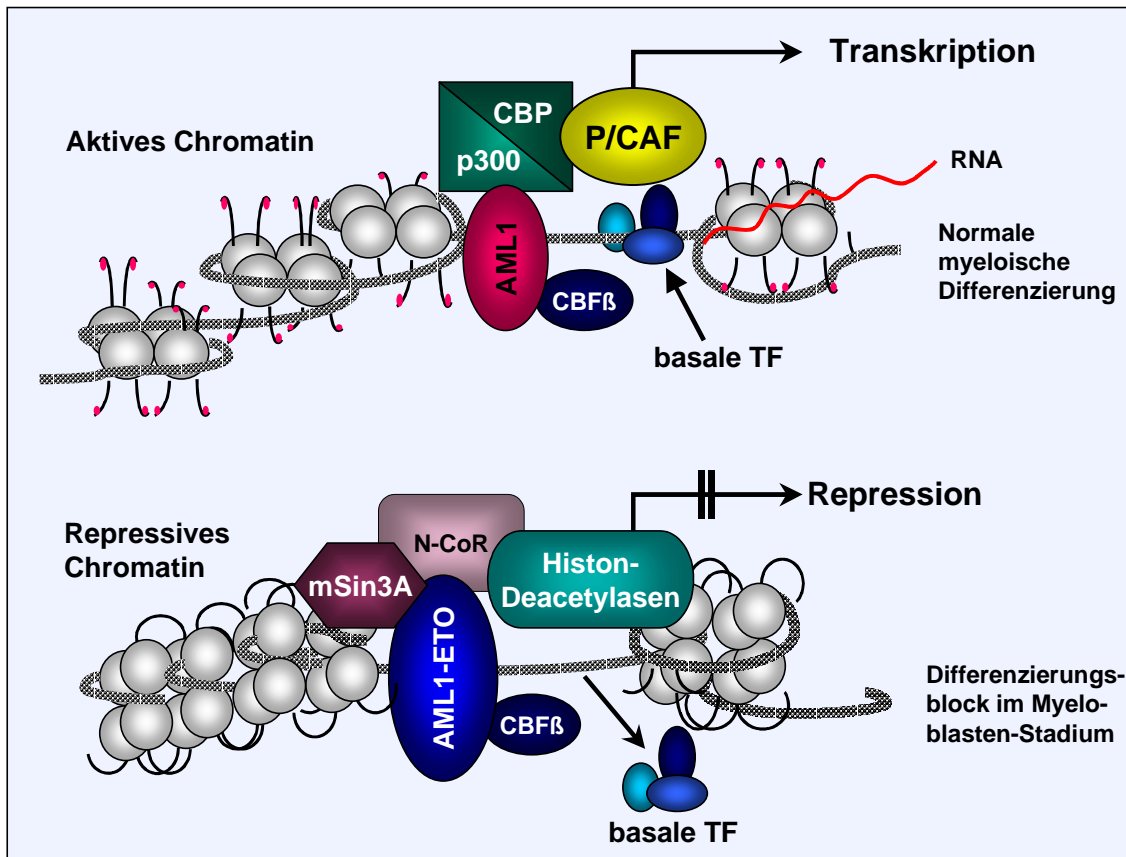


Abb. 8: Schematische Darstellung der Auswirkungen der Translokation t(8;21) auf das Chromatin und die Transkription relevanter Gene. Erläuterungen im Text. [Nach: Kitabayashi et al., 1998 und Gelmetti et al., 1998]

Wildtyp-AML1 interagiert mit p300/CBP, die über Histon-Acetyltransferase-Aktivität verfügen und somit für eine aufgelockerte und für Transkriptionsfaktoren zugängliche Chromatinstruktur sorgen. AML1-ETO bewirkt genau das Gegenteil: Durch die Translokation ist die Transaktivierungsdomäne von AML1, in der auch die p300/CBP-Bindungsstelle lokalisiert ist, durch ETO ersetzt. ETO assoziiert stattdessen mit dem N-CoR/mSin3/HDAC1-Komplex, der dadurch in die Nähe von AML1-abhängigen Promotoren gebracht wird [Gelmetti et al., 1998; Lutterbach et al., 1998; Wang et al., 1998]. Dort unterdrückt er aktiv die Transkription, indem er die Histone in einem deacetylierten Zustand hält und somit die DNA unzugänglich für die Transkriptionsmaschinerie (spezifische und basale Transkriptionsfaktoren) macht (siehe Kapitel 1.3.3). Die Repression AML1-abhängiger Gene führt zu einer Blockade der myeloischen Entwicklung und zur leukämischen Transformation der hämatopoetischen Vorläuferzellen. Die Entwicklung einer Therapieform, die spezifisch

den Aufbau des Corepressorkomplexes stört oder dessen Auswirkungen inhibiert bzw. kompensiert (siehe unten), könnte daher ein reizvolles und vielversprechendes Vorhaben darstellen.

1.3.3 Klinische Bedeutung von Histon-Deacetylase-Inhibitoren in der Therapie akuter Leukämien

Die lokale Umgestaltung von Chromatin und damit einhergehende dynamische Veränderungen in der nucleosomalen Verpackung der DNA spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation der Genexpression und beeinflussen so auch Differenzierungs- und Proliferationsvorgänge in der Zelle. Einer der wichtigsten und am besten untersuchten Mechanismen, mit dem Zellen die Chromatinstruktur regulieren, ist die posttranslationelle Modifizierung von Histonen durch Acetylierung bzw. Deacetylierung. Durch die Übertragung hydrophober Acetylgruppen auf Lysinreste in den aminoterminalen Armen der Histone H2B, H3 und H4 kommt es zu einer Destabilisierung der Histon-DNA-Interaktion [Grunstein, 1997; Ura et al., 1997; Hebbes et al., 1988; Tse et al., 1998; Walia et al., 1998; Kouzarides; 1999; Strahl & Allis; 2000]. Dadurch werden die Nucleosomen "aufgebrochen", und es entsteht eine gelockerte DNA-Struktur, die für die Transkriptionsmaschinerie leichter zugänglich ist, so daß die Transkription aktiviert wird. Dieser Prozeß wird durch Proteine vermittelt, die über Histon-Acetyltransferase-(HAT)-Aktivität verfügen wie z. B. p300/CBP und P/CAF [Martinez-Balbas et al., 1998; Blanco et al., 1998]. Enzyme, die Acetylgruppen spezifisch entfernen, werden als Histon-Deacetylasen (HDAC) bezeichnet. Das Entfernen der Acetylgruppen durch Histon-Deacetylasen bewirkt, daß die Histone wieder fester an die DNA binden, eine repressive Chromatinstruktur entsteht und die Transkription inhibiert wird [Pazin & Kadonaga, 1997; Heinzel et al., 1997].

Die Fähigkeit, den Acetylierungszustand der Histone spezifisch zu modulieren, stellt für die Zelle eine große Herausforderung dar. Probleme können z. B. dann auftreten, wenn Fusionsproteine entstehen, die nicht länger als Transkriptionsaktivatoren agieren, sondern stattdessen die Transkription durch Rekrutierung von Histon-Deacetylasen inhibieren. Dies ist nicht nur – wie bereits oben beschrieben – bei der Translokation t(8;21) der Fall, sondern auch bei vielen anderen Translokationen, die man bei akuten Leukämien vorfindet. Ein guter Ansatzpunkt für eine therapeutische Intervention könnten hier Histon-Deacetylase-Inhibitoren bieten. Mittlerweile kennt man eine Reihe von Substanzen, die die Aktivität von Histon-Deacetylasen *in vitro* und/oder

in vivo hemmen können. Dazu gehören u. a. Butyrat, Phenylbutyrat, Depudecin, Trapoxin (TPX), Trichostatin A (TSA), SAHA und Valproinsäure (VPA) [Boffa et al., 1978; Lea et al., 1995; Kwon et al., 1998; Kijima et al., 1993; Yoshida et al., 1990; Richon et al., 1998; Göttlicher et al., 2001]. Allerdings sind die Applikation der meisten dieser Substanzen noch mit Problemen verbunden, die einem Therapieerfolg im Weg stehen. Butyrat z. B. ist *in vivo* erst ab millimolaren Konzentrationen wirksam und außerdem nicht spezifisch für Histon-Deacetylasen, sondern beeinflusst u. a. auch die DNA-Methylierung und inhibiert die Phosphorylierung und Methylierung nuklearer Proteine [Krämer et al., 2001]. Darüber hinaus wird es im Serum sehr schnell abgebaut. Andere Inhibitoren reagieren zwar spezifischer, sind dafür aber toxisch.

Eine Kernfrage, die noch nicht vollständig geklärt ist, beschäftigt sich mit möglichen unerwünschten Effekten der genannten Substanzen auf das Chromatin gesunder Zellen. Wie oben erläutert, bewirken die Translokationen, die zu einer anomalen HDAC-Funktion führen, ja keine Veränderung des Enzyms selbst. Sie bringen lediglich das normale Enzym in eine Chromatin-Umgebung, in der es normalerweise nicht vorliegen würde. Trotzdem sprechen aus Tiermodellen resultierende Daten dafür, daß Histon-Deacetylase-Inhibitoren bevorzugt auf Tumorzellen reagieren, während gesunde Zellen mehr oder weniger unbeeinflusst bleiben [Velazquez et al., 1996; D'Argenio et al., 1996; Kim et al., 2001]. Die Gründe hierfür kennt man allerdings noch nicht.

Zur Zeit wird zum einen nach neuen, geeigneteren Histon-Deacetylase-Inhibitoren gesucht; zum anderen werden die bereits vorhandenen Substanzen intensiv auf ihren klinischen Nutzen hin getestet. Viele dieser Studien stehen im Zusammenhang mit der akuten promyelozytären Leukämie (APL), einer AML-M₃, die man bei ca. 10 % aller AML-Patienten vorfindet. Diese Leukämieform ist immer mit Translokationen assoziiert, bei denen der Retinsäure-Rezeptor α (RAR α) beteiligt ist und gilt mittlerweile als Musterbeispiel für die Folgen einer anomalen Transkription in der Pathogenese von Krebs. Bei einer APL-Patientin (mit PML-RAR α -Translokation), die gerade ihren dritten Rückfall erlitten hatte, führte eine Behandlung mit Phenylbutyrat in Kombination mit Retinsäure (ATRA) zu einer vollständigen Eliminierung der leukämischen Blasten. Auch sechs Monate später befand sich die Patientin noch einer kompletten molekularen Remission (PML-RAR α negativ) [Warrell et al., 1998]. Allerdings handelt es sich hier bisher um einen Einzelfall. Ähnlich vielversprechend könnte auch eine Behandlung der AML1-ETO-Leukämie ausfallen, denn auch hier besteht das onkogene Potential in der Rekrutierung eines Corepressor-Komplexes, der Histon-Deacetylasen

beinhaltet. So führte *in vitro* eine Behandlung der AML1-ETO-Zelllinie Kasumi-1 mit klinisch einsetzbaren Mengen an Phenylbutyrat zur einer partiellen Differenzierung der Zellen und zu Apoptose [Wang et al., 1999].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben wurde, stellt die "klassische" Behandlungsform der AML, die Chemotherapie, eine extreme Belastung für den ganzen Organismus dar. Die dabei eingesetzten myelotoxischen Medikamente wirken nur sehr unspezifisch auf die leukämischen Zellen, was zur Folge hat, daß auch viele gesunde Knochenmarkzellen abgetötet werden. Die Patienten leiden daher an einer schweren und lang anhaltenden Knochenmarkinsuffizienz und bedürfen einer intensiven Supportivtherapie. Besonders ältere Patienten sterben während der langen und strapaziösen Therapie frühzeitig an schweren Organschädigungen, Infektionen oder Blutungen. Ein weiteres Risiko besteht darin, daß Patienten nach erfolgter Behandlung jederzeit einen Rückfall erleiden können. Diesen Patienten kann nur noch durch eine Knochenmarktransplantation geholfen werden, aber für die wenigsten Patienten steht auch ein geeigneter Spender zur Verfügung. Diese Tatsachen zeigen die Notwendigkeit dafür auf, alternative Therapieformen zu entwickeln, die spezifischer auf Tumorzellen reagieren, ohne dabei die gesunden Zellpopulationen anzugreifen. Für die Patienten würde das eine besser verträgliche und damit schonendere Behandlungsweise darstellen.

Da die durch das Translokationsprodukt AML1-ETO vermittelte transkriptionelle Repression für die in den leukämischen Blasten vorliegende Differenzierungsblockade ausschlaggebend ist und diese Differenzierungsstörung nachweislich für die Entstehung einer AML-M₂ mitverantwortlich ist, stellt die spezifische Aufhebung dieser Repression eine vielversprechende Behandlungsalternative dar. Dabei liegt sicherlich – wie in Abschnitt 1.3.3 beschrieben - ein großes Potential in der Entwicklung neuer Histon-Deacetylase-Inhibitoren. Eine mindestens genauso erfolgsversprechende Strategie dürfte jedoch darin liegen, bereits den Aufbau des Corepressorkomplexes durch den Einsatz inhibitorischer Peptide zu unterbinden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, eine möglichst umfassende Strukturfunktionsanalyse des Translokationsproduktes AML1-ETO durchzuführen, so daß aus den dabei gewonnen Daten später Ansätze für eine "molekulare Therapie" in Form von therapeutischen

Peptiden abgeleitet werden können. Zu diesem Zweck müssen zunächst diejenigen Regionen in ETO identifiziert werden, die maßgeblich transkriptionelle Repression vermitteln. Anschließend soll untersucht werden, welche dieser Domänen für Interaktionen mit Proteinen des N-CoR/mSin3/HDAC1-Corepressorkomplexes erforderlich sind. Desweiteren wird auf die Rolle verschiedener ETO-Deletionsmutanten in der Bildung hochmolekularer Proteinkomplexe eingegangen und mit den gewonnenen Repressionsdaten in Zusammenhang gestellt. Zum Abschluß wird als "proof of principle" ein Protein vorgestellt, das zeigen soll, daß die Entwicklung "interferierender" Peptide zur Überwindung der AML1-ETO-vermittelten Repression grundsätzlich möglich sein sollte.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|-----------------------------------|
| Agarosegel-Apparatur | Life Technologies |
| Äkta (Gelfiltrationsanlage) | Amersham Pharmacia Biotech |
| Analysenwaage, R 160 P-D1 | Sartorius |
| Auslaufpipetten (2, 5, 10, 25 ml) | Becton Dickinson |
| Autoklav | Integra Biosciences |
| Blotting-Papier | Whatman |
| Brutschrank, CO ₂ -begast | Heraeus CO ₂ Auto Zero |
| Elektrophoresekammern | Life Technologies, BioRad |
| Expositionskassette | Kodak |
| FACScan | Becton Dickinson |
| Filmentwicklungseinrichtung | Optimax, MS Laborgeräte |
| Gel-Fotografier-Einrichtung | BioRad |
| Gewebeschalen für die Zellkultur | Greiner |
| Kühlschrank (4° C, -20° C) | Liebherr |
| Luminometer | E&G Berthold |
| Mikroskop mit Fotoaufsatz | Leitz Aristoplan |
| Mikrowelle | Sharp |
| PCR-Cycler, Gene Amp PCR System 2400 | Perkin Elmer |
| Petrischalen | Greiner |
| pH-Meßgerät | Knick Calimatic 761 |
| Pipettenspitzen | Greiner |
| Pipettierhilfe, elektrisch | Hirschmann |
| Polypropylen-Röhrchen | Falcon |
| Power Supplies | Life Technologies, BioRad |
| PVDF-Membran | Roth |
| Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml) | Eppendorf, Sarstedt |
| Reaktionsgefäße (15 und 50 ml) | Falcon |
| Röntgenfilm (Hyperfilm TM -MP) | Amersham Pharmacia Biotech |
| Schüttelinkubator, Brunswick Scientific G25 | Nunc, Cellstar |
| Speedvac | Bachofer |
| Spektrophotometer | BioRad |
| Sterilbank, LaminAir, HLB 2448 | Heraeus |
| Superose 6 HR 10/30 (Gelfiltrationssäule) | Amersham Pharmacia Biotech |
| Sterilfilter (0,22 und 0,45 µm) | Millipore |
| Tiefkühltruhe (-80° C) | Revco |
| Transilluminator | UVP |
| Vakuumpumpe | Bachofer |
| Vortexer | Janke & Kunkel |
| Wasserbad | GFL-juloba |
| Zählkammern | Hycor Biomedical Inc. |
| Zellkulturflaschen (T25, T75, T182) | Greiner |
| Zellkulturplatten (6-, 12-, und 24-Napf-Platten) | Greiner, Costar |
| Zellschaber | Costar |

2.1.2 Zentrifugen

| | |
|------------------|---|
| Tischzentrifugen | Beckman mit den Rotoren JA-20, JA-10 Eppendorf Centrifuge 5415 C Heraeus Biofuge 13 Heraeus Labofuge 400 R Heraeus Megafuge 1.0, 1.0 R |
| Ultrazentrifuge | Beckman L8-80 M mit den Rotoren VTi 50, Vti 60 und Vti 80 |

2.1.3 Chemikalien und Biochemikalien; Medien und Zusätze für die Zellkultur

| | |
|---|-------------------|
| Aceton | Roth |
| Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) | Roth |
| Agarose | Appligene |
| Ammoniumperoxodisulfat | Sigma-Aldrich |
| Ampicillin | Roth |
| Bovine Serum Albumin (BSA) | Sigma-Aldrich |
| Butanol | Roth |
| Brilliant Blue R (Coomassie Blau) | Roth |
| Bromphenolblau | Merck |
| Caesiumchlorid | Roth |
| Calciumchlorid | Sigma-Aldrich |
| Chloramphenicol | Sigma-Aldrich |
| Chloroform | Roth |
| Chloroquin | Sigma-Aldrich |
| Desoxynucleotide (dNTP's) | Pharmacia |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Serva |
| Dithiothreitol (DTT) | Serva |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) | Life Technologies |
| Enhanced chemiluminescence (ECL) | Pierce |
| Essigsäure | Roth |
| Ethanol | Roth |
| Ethidiumbromid | Roth |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Serva |
| Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA) | Sigma-Aldrich |
| Fötale Kälberserum (FCS) | Seromed |
| Gelatine | Sigma-Aldrich |
| Geneticin (G418) | Life Technologies |
| Glucose | Merck |
| L-Glutamin | Life Technologies |
| Glutathion Sepharose | Sigma-Aldrich |
| Glycerin | Roth |
| Glycogen | Boehringer |
| Hank's gepufferte Salzlösung (HBSS) | Sigma-Aldrich |
| HEPES | Roth |
| Isopropanol | Roth |

| | |
|---|----------------------------|
| Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside (IPTG) | Sigma-Aldrich |
| Kaliumacetat | Roth |
| Laemmli-Puffer (Roti-Load) | Roth |
| LB-Agar (Lennox L Agar) | Life Technologies |
| LB Broth Base (Lennox L Broth Base) | Life Technologies |
| Lysozym | Serva |
| Magnesiumchlorid | Roth |
| β-Mercaptoethanol | Roth |
| Methanol | Roth |
| Milchpulver | Neuform |
| Mineralöl | Sigma-Aldrich |
| NAP-Säule (NAP TM -25 Column) | Pharmacia |
| Natriumacetat | Roth |
| Natriumchlorid | Roth |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Roth |
| Natriumhydroxid | Roth |
| Nonidet P-40 | Serva |
| Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) | Life Technologies |
| Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol | Biometra |
| Phenol | Roth |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) | Sigma-Aldrich |
| Phosphat gepufferte Salzlösung | PAA |
| Polybrene | Sigma-Aldrich |
| Protaminsulfat | Sigma-Aldrich |
| Protein-A-Sepharose | Amersham Pharmacia Biotech |
| Protein-A/G-Agarose | Santa Cruz Biotechnologies |
| Protease-Inhibitoren Cocktail (complete TM) | Roche Diagnostics GmbH |
| Retronectin | Takara Shuzo Co. |
| rh IL-3 | R & D Systems |
| RPMI 1640 Medium | Life Technologies |
| Salzsäure | Roth |
| Sucrose | Sigma |
| TEMED | Roth |
| Tris | Sigma-Aldrich |
| Tris-HCl | Sigma-Aldrich |
| Triton X-100 | Serva |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich |
| Trypsin/EDTA | Life Technologies |
| Tween-20 | Sigma-Aldrich |
| Xylencyanol | Roth |

2.1.4 Radioaktive Reagenzien

[³⁵S]Methionin (>1.000 Ci/mmol; 10 mCi/ml) Amersham Pharmacia Biotech

2.1.5 Enzyme

| | |
|------------------------------------|---------------------|
| Alkalische Phosphatase (CIP) | New England Biolabs |
| Ampli-Taq-DNA-Polymerase | Perkin Elmer |
| Klenow-Fragment (DNA-Polymerase I) | New England Biolabs |
| MuLV Reverse Transkriptase | Perkin Elmer |
| Pfu Turbo DNA-Polymerase | Stratagene |
| RNase A | Sigma-Aldrich |
| RNasin (RNase-Inhibitor) | Promega |
| Restriktionsendonucleasen | New England Biolabs |
| T4 DNA-Ligase | New England Biolabs |
| T7 Polymerase | Promega |

2.1.6 Antikörper

| | |
|--|---------------------------|
| Anti-ETO (Ab-1) | Calbiochem |
| Anti-Gal4-DBD (RK5C1; Maus, monoklonal) | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-Maus IgG-Peroxidase | Transduction Laboratories |
| Anti-mSin3A (K20; Kaninchen, polyklonal) | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-Kaninchen IgG-Peroxidase | Transduction Laboratories |

2.1.7 Marker und Größenstandards

| | |
|-------------------------------------|-------------------|
| BenchMark prestained protein ladder | Life Technologies |
| Smartladder | Eurogentec |

2.1.8 Oligonucleotide

Für die Klonierung der Konstrukte pcNC-VP16 und pcNC-KBP wurden die unten stehenden Oligonucleotide entworfen, die von der Firma INTERACTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm, synthetisiert wurden. Die einzelsträngigen Oligonucleotide wurden - wie in Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben – mit ihren komplementären Sequenzen hybridisiert, so daß doppelsträngige DNA-Fragmente entstanden:

Flag-NLS-Spacer:

HindIII *Flag-Epitop*
 5' - **AG CTT** GCC ACC ATG GAC TAC AAG GAT GAC GAT GAC AAG **CCA AAG**
 3' - **A** CGG TGG TAC CTG ATG TTC CTA CTG CTA CTG TTC **GTG GTC**
M D Y K D D D D K P K

NLS *Spacer* *NotI*
AAG AAG AGG AAG GGG TCT GGC AGC **GCG GCC GCC** GCA GGA GGC TCA
TTC TTC TCC TTC CCC AGA CCG TCG **CGC CGG CGG** CGT CCT CCG AGT
K K R K G S G S

XhoI
 AGC GGT **C** - 3'
 TCG CCA **GAG CT** - 5'

EcoRI-Linker:

XhoI *EcoRI* *XbaI*
 5' - **TCG AGG** GCA GCG GAT CCC **GGA ATT CAT** - 3'
 3' - **CC** CGT CGC CTA GGG **CCT TAA GTA GAT C** - 5'

KBP2.20:

XhoI *Spacer* *KBP2.20*
 5' - **TC GAG** GGC AGC GGA TCC TGG GCT GTT TAT GAA CTT CTC TTC TAG
 3' - **C** CCG TCG CCT AGG ACC CGA CAA ATA CTT GAA GAG AAG ATC
G S G S W A V Y E L L F ★

XbaI
T - 3'
 AG ATC - 5'

Zur Herstellung des Vektors PINCO-XP wurde das folgende Linker-Fragment synthetisiert (BioSpring Gesellschaft für Biotechnologie mbH, Frankfurt) und zwischen die *Bam*HI- und *Eco*RI-Schnittstellen in den Vektor PINCO (Abb. 10) eingefügt:

XP-Linker:

*Bam*HI *XhoI* *PmeI* *Eco*RI
 5' - **GAT CCG** CGA TCC **TCG AGC** GGA GCT TTG **TTT AAA CGG** CCC GG - 3'
 3' - **GC** GCT AGG **AGC TCG** CCT CGA AAC **C AAA TTT G** CCC GGG **CCT TAA** - 5'

2.1.9 Eukaryotische Expressionsvektoren

pcDNA3

Invitrogen™ Life Technologies

pcETO

Olaf Heidenreich, Tübingen

pCMX-GAL4

Thorsten Heinzl, Frankfurt

pCMX-GAL4-N-CoR1-312

Thorsten Heinzl, Frankfurt

pGEX-AHK

Thorsten Heinzl, Frankfurt

pCMX-VP16

Edith Pfitzner, Frankfurt

pMT-mSin3A

Thorsten Heinzl, Frankfurt

FLAG-N-CoR

Thorsten Heinzl, Frankfurt

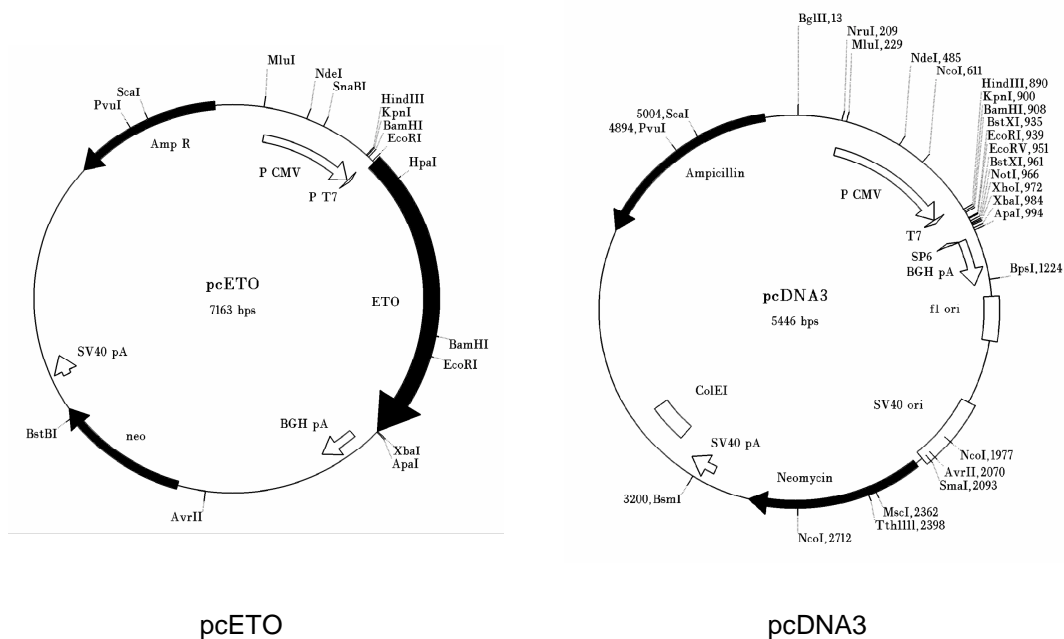
2xUAS-TK-luc

Thorsten Heinzl, Frankfurt

Δprom-Renilla

Irene Stotko, GSH

Die Vektoren, die für als Grundlage für weitere Klonierungen dienen, sind untenstehend in Form von Plasmidkarten dargestellt:



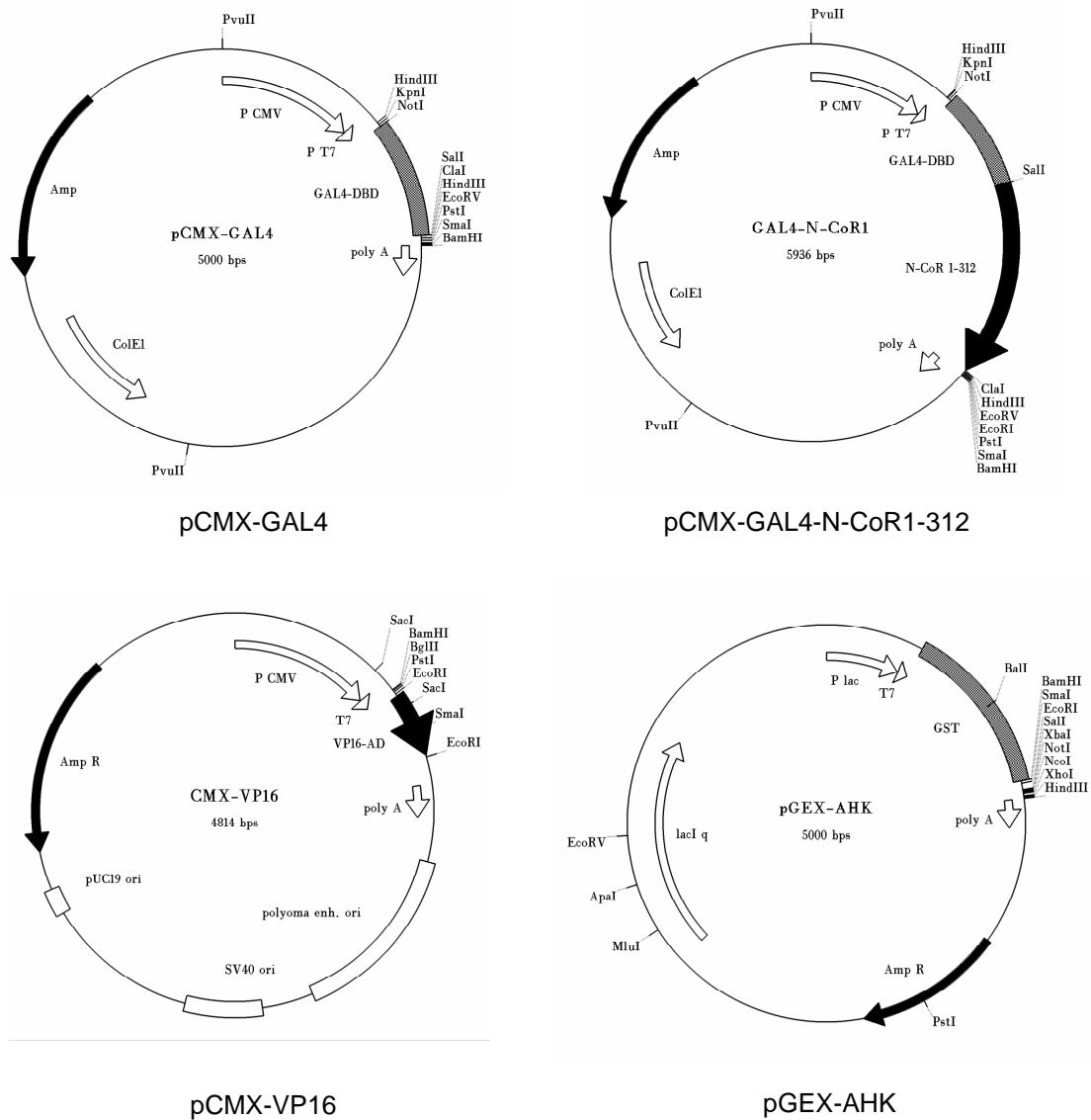


Abb. 9: Eukaryotische Expressionsvektoren, die für Klonierzwecke eingesetzt wurden. P CMV = CMV-Promotor; T7 = T7-Promotor; Sp6 = Sp6-Promotor; MCS = "multiple cloning site"; poly A = Polyadenylierungssignal; SV40 ori = "simian virus 40 replication origin"; SV40 poly A = "simian virus 40"-Polyadenylierungssignal; Neomycin (neo) = Neomycin-Resistenzgen; Amp = Ampicillin-Resistenzgen; GAL4-DBD = DNA-bindende Domäne (AS 1 – 147) des hefespezifischen Transkriptionsfaktors GAL4; P lac = Lac-Promotor; GST = Glutathion-S-Transferase; AD = Aktivierungsdomäne; bps = Basenpaare.

2.1.10 Der retrovirale Vektor PINCO

Für die Transduktion hämatopoetischer Zellen wurde der retrovirale Vektor "PINCO" [Grignani et al., 1998] verwendet:

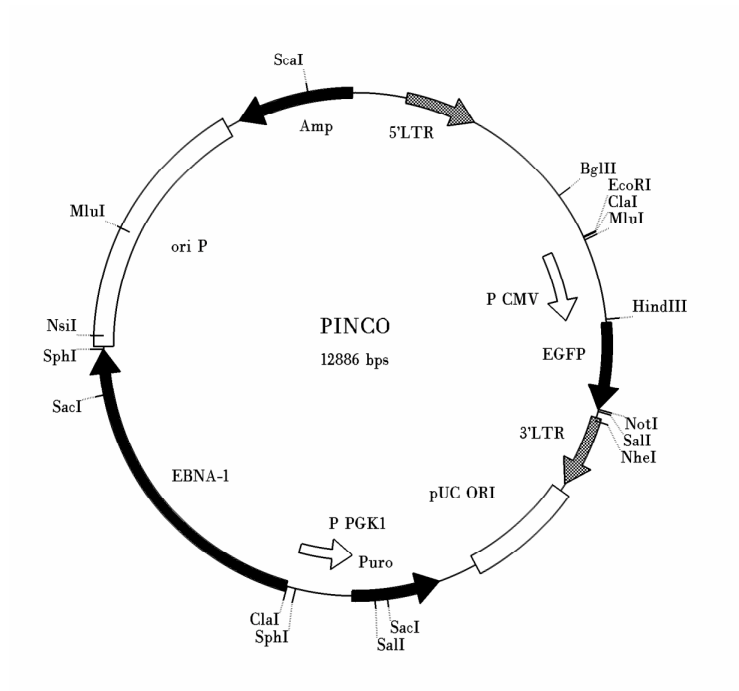


Abb. 10: PINCO. Die 5'- und 3'-LTR ("long terminal repeats") stammen aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus. P CMV = CMV-Promotor; EGFP = "enhanced green fluorescence protein"; pUC ORI = pUC replication origin; Puro = Puromycin-Resistenzgen; P PGK1 = PGK1-Promotor; EBNA-1 = Epstein-Barr-Kernantigen aus dem EBV- (Epstein-Barr-Virus-) Genom; ori P = ori P Replicon aus dem EBV-Genom; Amp = Ampicillin-Resistenzgen. [Referenz: Grignani et al., 1998]

2.1.11 Bakterienstämme (Escherichia coli)

One Shot™ (TOP 10F')

Invitrogen

Genotyp: F'*{lacI^q TN10(Tet^R)}**mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* *endA1* *nupG*

Stbl2™

Life Technologies

Genotyp: F *mcrA* Δ (*mcrBC-hsdRMS-mrr*) *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi* *supE44* *relA1* λ' Δ (*lac-proAB*)

XL1-Blue

Stratagene

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F⁺ *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^R)]

BL21 (DE3) pLysS

Stratagene

Genotyp: B F- *dcm ompT hsdS*(r_B- m_B-) *gal* (DE3) [pLysS Cam^r]^a

2.1.12 Medien für die Bakterienkultur

2.1.12.1 5fach LB-Flüssigmedium

Zur Herstellung von 5fach LB-Flüssigmedium wurden 100g LB Broth Base pro Liter dH₂O eingewogen und autoklaviert. Vor Gebrauch wurden 100 ml 5fach LB-Medium mit dH₂O auf 500 ml aufgefüllt und je nach Bedarf das gewünschte Antibiotikum hinzugesetzt.

2.1.12.2 LB-Agar

Zur Herstellung von LB-Agar wurden 32g LB-Agar pro Liter dH₂O eingewogen und autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde nach Bedarf das gewünschte Antibiotikum hinzugegeben und der Agar in Petrischalen gegossen. Nach dem Trocknen waren die LB-Agar-Schalen für mehrere Wochen bei 4° C lagerbar.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Arbeiten mit *E. coli* und Präparation von Plasmid-DNA

2.2.1.1 Transformation kompetenter Bakterienstämme

Unter Transformation versteht man das Einschleusen von DNA in kompetente Bakterien: 50 μ l kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und die entsprechende DNA (z. B. 5 μ l eines 10 μ l Ligationsansatzes oder 1 - 10 ng Plasmid-DNA für eine Retransformation) hinzupipettiert und vorsichtig mit der Pipettenspitze vermischt. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock (45 sec, 42° C) unterzogen. Unmittelbar danach wurden sie nochmals für 2 min auf Eis gestellt, bevor sie auf einer LB-Agar-Platte ausplattiert und über Nacht im Brutschrank (gewöhnlich bei 37° C) inkubiert wurden. Da die verwendeten Plasmide in der Regel eine Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum tragen, findet eine Selektion der positiven Transformanten statt, sofern die Bakterien auf Antibiotikahaltigem Agar ausplattiert wurden. 12 – 24 Stunden später wurden die Kolonien zur Vermehrung von der Platte gepickt und in 5 ml LB-Flüssigmedium unter Schütteln (37° C, 200 rpm) über Nacht kultiviert.

2.2.1.2 Plasmid-Minipräparation durch Alkalische Lyse

Diese Methode wurde zur Präparation kleinerer Mengen an Plasmid-DNA (5 – 10 μ g) aus einer 5ml-Übernachtskultur durchgeführt. Dazu wurden je 1,5 ml der Übernachtskulturen in Eppendorf-Gefäße überführt, 30 sec mit 14.000 rpm zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Bakteriensedimente wurden in je 100 μ l TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA) resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von je 200 μ l Lysispuffer (200 mM NaOH; 1 % [w/v] SDS), wonach die Proben vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert wurden. Zur Neutralisierung wurden je 150 μ l 3 M KAc, pH 4,8, hinzugefügt und die Proben sofort durch Vortexen gemischt und 5 min auf Eis gestellt. Durch die anschließende 15 minütige Zentrifugation bei 4° C und 13.000 rpm wurden die ausgefallenen Proteine, Membranbestandteile und chromosomale DNA sedimentiert. Die niedermolekulare Plasmid-DNA befand sich im Überstand, der in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt

wurde. Zur Fällung wurde die Plasmid-DNA mit 260 µl 100 %igem Isopropanol versetzt und 30 min bei 4° C und 13.000 rpm zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen des Sedimentes mit 70 %igem Ethanol wurde es in 25 µl TE resuspendiert.

2.2.1.3 Plasmid-Maxipräparation über Caesiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation

Um besonders reine Plasmid-DNA für Arbeiten in der Zellkultur zu gewinnen, wurde eine Maxipräparation über zweifache Dichtegradienten-Zentrifugation durchgeführt. 500 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium wurden mit 2,5 ml Übernachtskultur der mit dem gewünschten Plasmid transformierten Bakterien versetzt und Ü/N bei 37° C im Schüttler (200 rpm) inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde 10 min bei 4° C und 5.000 rpm zentrifugiert (Rotor JA-10, Beckman-Zentrifuge), der Überstand verworfen und das Bakteriensediment in 10 ml gekühltem Sucrose-Puffer (25 % [w/v] Sucrose; 25 mM Tris-HCl, pH 8) resuspendiert. Die Probe wurde in ein 30ml-Zentrifugenröhrchen überführt und die Bakterienlyse durch Zugabe von 2,5 ml Lysozymbilösung (10 mg/ml Lysozym; 25 mM Tris-HCl, pH 8) und 5minütige Inkubation bei 4°C eingeleitet. Dann wurden 1,3 ml 0,25 M EDTA, pH 8, zugegeben und die Probe weitere 15 min bei 4° C inkubiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch Zugabe von 10 ml gekühltem Triton-Lysis-Mix (0,3 % [v/v] Triton X-100; 187 mM EDTA; 15 mM Tris-HCl, pH 8) und darauffolgender 10minütiger Inkubation im 45°C-Wasserbad. Anschließend wurde das viskose Gemisch 30 min bei 4° C und 20.000 rpm zentrifugiert (Rotor JA-20, Beckman-Zentrifuge), um Zelltrümmer und chromosomale DNA zu sedimentieren. Unmittelbar nach der Zentrifugation wurde der Überstand in ein 50ml-Falcon-Röhrchen dekantiert und sein Volumen bestimmt. Pro ml Überstand wurde 1 g CsCl eingewogen und die Probe bis zum vollständigen Lösen des Caesiumchlorids in ein 40°C-Wasserbad gestellt. Danach schloß sich eine 15minütige Zentrifugation bei 20° C und 3.200 rpm (Heraeus-Megafuge 1.0 R) an, wonach die abzutrennenden Proteine auf dem Überstand schwammen. Dieser wurde ohne die Proteine in ein VTi50-Röhrchen, in das 50 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) vorgelegt wurden, überführt. Das Restvolumen wurde mit CsCl-Lösung (1 g CsCl/ml TE) aufgefüllt und das Röhrchen verschlossen. Die Probe wurde für mindestens 18 h bei 20° C, 50.000 rpm und ohne Bremse in der Beckman-Ultrazentrifuge (Rotor VTi 50) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation zeigten sich aufgrund der Ethidiumbromid-Einlagerung zwei rosafarbene Banden: die untere enthielt die gewünschte Plasmid-DNA, die obere genomische DNA und „genickte“ Plasmid-DNA (nach Strangbrüchen linearisierte Plasmid-DNA). Eine weitere Bande

befand sich als vertikaler Streifen am Innenrand des Röhrchens; sie enthielt RNA. Die untere Plasmid-Bande wurde abgezogen und in ein VTi80-Röhrchen überführt. Die zweite Dichtegradient-Zentrifugation erfolgte Ü/N bei 20° C, 20.000 rpm und ohne Bremse im Rotor VTi 80. Die DNA-Bande wurde erneut abgezogen und in ein 15ml-Röhrchen überführt. Das Ethidiumbromid wurde durch mehrmaliges Waschen mit TE-gesättigtem n-Butanol extrahiert und die DNA über einen NAP-25-Säulen-Lauf entsalzt. Zur DNA-Fällung wurden 1/10 Vol. 3 M NaAc, pH 7, sowie 7/10 Vol. Isopropanol hinzugegeben und 20 min bei 4° C und 4.000 rpm zentrifugiert (Heraeus-Megafuge 1.0 R). Anschließend wurde das Sediment noch dreimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 500 µl TE aufgenommen.

2.2.1.4 Herstellung kompetenter Bakterienzellen nach der Rubidiumchlorid-Methode

Zuerst wurde ein Aliquot der gewünschten Bakterien mit einer sterilen Impföse auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Ein Klon wurde dann in 5 ml LB-Medium überführt und Ü/N unter Schütteln vermehrt. 500 ml LB-Medium wurden mit 1 ml der Übernackkultur beimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis die Bakterienkultur eine OD_{595nm} von 0,4 bis 0,6 erreichte. Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt, und alle nachfolgenden Schritte fanden ebenfalls auf Eis bzw. unter Kühlung und mit vorgekühlten Lösungen und Arbeitsmaterialien (Pipetten, Zentrifugenbecher) statt. Die Bakterien wurden zentrifugiert (2.500 rpm, 10 min, 4° C), und das Pellet in 150 ml TFB I-Puffer (15 % [v/v] Glycerin; 10 mM Calciumchlorid; 30 mM Kaliumacetat, pH 5,8; 100 mM Rubidiumchlorid; 50 mM Manganchlorid) resuspendiert und 15 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension nochmal zentrifugiert (2.500 rpm, 10 min, 4° C), das Pellet in 20 ml TFB II-Puffer (15 % [v/v] Glycerin; 10 mM MOPS, pH 7; 10 mM $RbCl_2$; 75 mM $CaCl_2$) aufgenommen und die Bakterien sofort in 100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° C gelagert.

2.2.2 Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Restriktion von Plasmid-DNA

Bei den für den Verdau von Plasmid-DNA verwendeten Enzymen handelt es sich um Restriktionsendonucleasen vom Typ II, die innerhalb spezifischer Basensequenzen Phosphodiester-Bindungen im doppelsträngigen DNA-Molekül spalten. Dabei entstehen entweder glatte Enden („blunt ends“) oder 5'- bzw. 3'-überhängende Enden („sticky ends“). Für einen Restriktionsansatz zu analytischen Zwecken wurden 0,5 – 1 µg Plasmid-DNA mit etwa 5fachem Enzymüberschuß (5 U Enzym/µg DNA) im vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer geschnitten. Die Reaktion erfolgte während 1 – 2ständiger Inkubation bei der für das Enzym empfohlenen Temperatur. Bei Doppelrestriktionen mit Enzymen, die im selben Reaktionspuffer schneiden, wurden beide Enzyme gleichzeitig in den Restriktionsansatz gegeben werden. Benötigten die Enzyme unterschiedliche Reaktionspuffer, wurde die DNA zunächst mit einem Enzym geschnitten und vor der zweiten Restriktion einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Dazu wurde das gleiche Volumen an Phenol/Chloroform zum Reaktionsansatz gegeben und die wäßrige Phase, die die DNA enthielt, abgenommen. Zu der wäßrigen Phase wurde das gleiche Volumen Chloroform hinzugegeben sowie 1/10 Vol. 3 M NaAc, pH 7, 1 µl Glykogen und 0,7 Vol. Isopropanol. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 4° C und 13.000 rpm wurde die sedimentierte DNA dreimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem geeignetem Volumen TE (10 mM Tris, pH 8; 10 mM EDTA) aufgenommen.

2.2.2.2 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Dieses Verfahren wurde angewendet, um bei einer nachfolgenden Ligation die Selbstzirkularisierung des linearisierten Vektors ohne Einbau eines Inserts zu vermeiden. Verwendet wurde hierzu das Enzym Alkalische Phosphatase (CIP), das die Phosphatreste an den 5'-Enden der DNA-Fragmente abspaltet. Die Reaktion wurde direkt im Anschluß an die Restriktion durchgeführt. Dazu wurden zum Restriktionsansatz die entsprechende Menge an CIP-Puffer und 1 µl CIP gegeben und der Ansatz 1 h bei 37° C inkubiert. Die Enzymaktivität wurde durch Zugabe von EDTA [20 mM Endkonzentration] gestoppt und die DNA einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen.

2.2.2.3 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden

DNA-Enden mit 5'-Überhängen wurden nach Bedarf mit Hilfe des Klenow-Fragments (große Untereinheit der DNA-Polymerase I von *E. coli*) zu glatten Enden aufgefüllt. Dazu wurde die zuvor geschnittene DNA auf eine Konzentration von 50 µg/ml eingestellt, der entsprechende Reaktionspuffer, dNTP's [100 µM Endkonzentration] und Klenow-Enzym [1 U/µg DNA] hinzugefügt und der Reaktionsansatz für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Glättung von 3'-überhängenden Enden wurde ebenfalls Klenow-Fragment verwendet, denn dieses verfügt neben seiner Polymeraseaktivität auch über eine 3'-5'-Exonucleaseaktivität. Allerdings wurden in diesem Fall die überhängenden Enden nicht aufgefüllt, sondern abgebaut, so daß ein 2 – 4 Nucleotide kürzeres Fragment entstand. Die Reaktion wurde wie die Auffüllreaktion durchgeführt. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch EDTA-Zugabe [10 mM Endkonzentration] und 10minütiger Inkubation bei 75° C.

2.2.2.4 Ligation von DNA

Bei einer Ligation kommt es zur Verknüpfung zweier DNA-Enden. Die Reaktion wird durch DNA-Ligasen katalysiert, wobei Phosphodiester-Bindungen zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-OH-Gruppe gebildet werden. Ein Standard-Ligationsansatz bestand aus 10 – 50 ng Vektor-DNA, 3 – 10fachem molaren Überschuß an Insert-DNA, Ligasepuffer und 400 U T4-DNA-Ligase und wurde in einem Volumen von 10 – 20 µl angesetzt.

Die einzusetzende Insertmenge bei vorgegebener Vektormenge wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Insert [ng]} = \frac{\text{Vektor [ng]} \cdot \text{Insertgröße [kb]}}{\text{Vektorgröße [kb]}} \quad \bullet \quad \text{molare Ratio Insert / Vektor}$$

Die Reaktion erfolgte im Ligationswasserbad bei 16° C für 4 bis 16 Stunden. Um die Qualität des Vektors in der nachfolgenden Transformation abschätzen zu können, wurde als Kontrolle eine Ligation ohne Insert durchgeführt.

2.2.3 Amplifizierung von DNA-Sequenzen durch PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) können definierte DNA-Sequenzen aus einem Gemisch von DNA-Molekülen angereichert werden. Das hierzu benötigte Enzym ist eine thermostabile DNA-Polymerase (*Pfu Turbo-Polymerase*), die einen Einzelstrang zum Doppelstrang aufpolymerisieren kann, sofern ihr ein kurzer doppelsträngiger Bereich als Ansatzpunkt zur Verfügung steht. Deshalb setzt man der Reaktion zwei chemisch synthetisierte, strangspezifische Oligonucleotide zu, die als Primer dienen und jeweils an einen der beiden DNA-Stränge hybridisieren. Die Reaktion läuft in drei Zyklen ab, die mehrfach (20 – 35 mal) wiederholt werden. Im ersten Zyklus wird die DNA durch Hitzebehandlung zum Einzelstrang denaturiert (Denaturierungsschritt), im zweiten erfolgt die Hybridisierung der strangspezifischen Primer (Annealingschritt) und im dritten die Auffüllreaktion zum Doppelstrang durch die DNA-Polymerase in Gegenwart von dNTPs (Elongationsschritt).

Für die Amplifikation der NC-Domäne aus pcETO wurde das folgende Primer-Paar (synthetisiert von der Firma INTERACTIVA Biotechnologie GmbH, Ulm) verwendet:

Vorwärts-Primer (*NotI*-NC for):

5'- C AGG AAT CAG **GCG GCC GCA** ^{*NotI* ➔ NC-Domäne} GGC ACA CGT CAA GAA GAA ATG -3'

Rückwärts-Primer (*NC-XhoI* rev):

5'- GTC GAT CCG **CTC GAG** ^{*XhoI* ➔ NC-Domäne} CCG ATG CGC GTC TAG TGC AAC -3'

Die PCR-Reaktion wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

PCR-Ansatz:

100 ng Template-DNA
 0,5 µM Vorwärts-Primer
 0,5 µM Rückwärts-Primer
 40 µM dNTPs
 5 µl 10fach PCR-Puffer
 2,5 U *Pfu* Turbo-Polymerase
 ad 50 µl dH₂O

PCR-Programm A:

2 min – 94° C
 45 sec – 94° C
 1 min – 60° C
 2 min – 68° C
 } 20 Zyklen
 10 min – 68° C

Der PCR-Ansatz wurde nach der Reaktion auf ein Agarosegel aufgetragen und das gewünschte Produkt aus dem Gel isoliert. Danach wurde es mit *NotI* und *XhoI* geschnitten, durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung aufgereinigt und für die Ligation mit den entsprechend vorbereiteten Vektoren (pcFlag-NLS-Spacer-*EcoRI* bzw. pcFlag-NLS-Spacer-KBP) eingesetzt.

Für die Klonierung der GST-ETO-Fusionskonstrukte GST-N, GST-N+NHR2, GST-NHR2, GST-NHR2+C und GST-C wurden die entsprechenden Sequenzen aus dem Plasmid pcETO amplifiziert. Die dazu verwendeten Oligonucleotid-Primer (hergestellt von der Firma BioSpring Gesellschaft für Biotechnologie mbH, Frankfurt) sind in Tab. 8 (Abschnitt 3.2.1.3) angegeben. Der PCR-Ansatz wurde nach oben stehenden Angaben zusammenpipettiert und die PCR-Reaktion nach folgendem Programm durchgeführt:

PCR-Programm B:

2 min – 94° C

| | |
|----------------|-------------|
| 45 sec – 94° C | } 20 Zyklen |
| 1 min – 68° C | |
| 3 min – 72° C | |

10 min – 72° C

Die aus dem Gel isolierten PCR-Produkte wurden mit *XbaI* und *HindIII* restringiert, durch Phenol/Chloroform-Extraktion und EtOH-Fällung aufgereinigt und mit dem entsprechend geschnittenen Vektor pGEX-AHK ligiert.

Zur Herstellung des retroviralen Konstruktes PINCO-NC-VP16 wurde die für NC-VP16 codierende Sequenz aus dem Plasmid pcNC-VP16 unter Verwendung folgender Primer amplifiziert:

Vorwärts-Primer (*SalI*-NC-VP16 for):

5'- CAG GAA TCA ^{*SalI*} **GTC GAC** AAG CTT GCC ACC ATG GAC -3' ➡ Start NC-VP16

Rückwärts-Primer (NC-VP16-*PmeI* rev):

5'- GCT ATG GCC GAC ^{*PmeI*} **CGT TTA AAC** CTA CCC ACC GTA CTC GTC -3'

Die PCR-Reaktion wurde nach oben stehenden Angaben zusammenpipettiert und unter Verwendung von Programm B durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde nach der Gelextraktion mit *Sall* und *PmeI* geschnitten, aufgereinigt und zwischen die *XhoI*- und *PmeI*-Schnittstellen des Vektors PINCO-XP kloniert.

2.2.4 Mutagenese-PCR

Um für Klonierungszwecke neue Schnittstellen in den Plasmiden pcETO und pCMX-GAL4-ETO Δ 1-236 zu generieren, wurden je nach Bedarf ein bis drei Basenpaare in der Ausgangssequenz mutiert. Dazu wurde das "QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit" der Firma Stratagene verwendet. Für jede Reaktion wurden zwei komplementäre Oligonucleotid-Primer entworfen, die die gewünschte(n) Mutation(en) beinhalteten. Die PCR wurde mit der *Pfu* Turbo-DNA-Polymerase, die über eine "Proofreading-Aktivität" verfügt, nach folgendem Protokoll durchgeführt:

| <u>PCR-Ansatz:</u> | <u>PCR-Programm:</u> | |
|--|---|-----------|
| 1 μ l Template-DNA [100 ng/ μ l] | 30 sec – 94° C | |
| 1,25 μ l Vorwärts-Primer [100 ng/ μ l] | 30 sec – 94° C } 1 min – 55° C } 20 min – 68° C } | 20 Zyklen |
| 1,25 μ l Rückwärts-Primer [100 ng/ μ l] | | |
| 5 μ l 10fach Reaktionspuffer | | |
| 7,5 μ l dNTP-Mix [5 mM] | | |
| 1 μ l <i>Pfu</i> Turbo-Polymerase [2,5 U/ μ l] | | |
| ad 50 μ l dH ₂ O | 20 min – 68° C | |

Unmittelbar nach der PCR-Reaktion wurde der komplette Ansatz einem *DpnI*-Verdau unterzogen. Dieses Enzym schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA, nicht aber unmethylierte. Demzufolge soll die als Template eingesetzte Plasmid-DNA, die aus einem Bakterienstamm mit *dam*-Methylierungssystem präpariert wurde, durch *DpnI* geschnitten werden. Die während der PCR-Reaktion neu synthetisierte DNA ist dagegen nicht methyliert und sollte daher auch nicht geschnitten werden, so daß eine Selektion der neu synthetisierten DNA stattfinden sollte. Nach der *DpnI*-Reaktion wurde je ein Zehntel des Ansatzes in 50 μ l kompetente XL-1-Blue Bakterien transformiert, die mit Hilfe ihres Reparatursystems die "genickte" DNA wieder zu einem Plasmid zusammenligierten, so daß Kolonien entstehen konnten. Die daraus präparierte DNA wurde dann mittels Restriktionsanalyse auf die gewünschte Mutation hin untersucht.

2.2.5 Hybridisierung von Oligonucleotiden

Die lyophilisierten Oligonucleotide wurden in dH₂O gelöst und dabei auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. Zur Hybridisierung wurden je 9 µg der beiden komplementären Oligonucleotide in einem 20µl-Reaktionsansatz mit 50mM NaCl und 20 mM Tris, pH 7,4, zusammenpipettiert und in einem mit Wasser gefüllten Becherglas 5 min bei 95° C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte während des langsamen Abkühlens des Reaktionsansatzes von 95° C auf RT.

2.2.6 Agarosegele

2.2.6.1 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Moleküle verfügen über ein Zucker-Phosphat-Rückgrat, das ihnen eine negative Ladung verleiht. Sie wandern daher in der Gelelektrophorese zur Anode; je größer die Moleküle sind, um so langsamer wandern sie. Zur Auftrennung von großen Fragmenten wählt man deshalb ein Gel mit niedrigerer Agarosekonzentration als zur Auftrennung von kleinen Fragmenten. Üblicherweise werden je nach zu erwartender Fragmentgröße 0,7 bis 2 %ige Gele verwendet. Zur Herstellung eines 1%igen Agarosegels wurde 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, pH 7,8; 5 mM EDTA) in der Mikrowelle erhitzt, bis es vollständig gelöst war. Nach Abkühlung wurde die Lösung mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, auf einen Gelträger gegossen und mit einem Probenkamm versehen. Nach dem Erstarren wurde das Gel in einer horizontalen Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer überschichtet und der Probenkamm wieder entfernt. Um das Absinken der Proben in die Geltaschen zu ermöglichen, wurden diese vor dem Auftragen mit der entsprechenden Menge an 5fach-Auftragspuffer (20 % [w/v] Ficoll 400; 100 mM EDTA; 0,025 % [w/v] Xylencyanol und 0,025 % [w/v] Bromphenolblau) versetzt und anschließend bei einer Spannung von 100 V bei einem Elektrodenabstand von 10 cm aufgetrennt. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen wurde ein Größenstandard mit auf das Gel aufgetragen. Aufgrund der Einlagerung des Ethidiumbromids während des Gellaufs fluoresziert die DNA bei Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) rot-orangefarbig. Die DNA-Fragmente konnten deshalb auf einem Transilluminator angesehen und bei Bedarf fotografiert werden.

2.2.6.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur DNA-Extraktion aus Agarosegelen für Klonierungszwecke wurde der Kit „Qiaex® II“ der Firma Qiagen verwendet. Nach dem Schneiden durch das jeweilige Restriktionsenzym und der Auftrennung über ein Agarosegel wurde die Bande, die das gewünschte DNA-Fragment enthält, aus dem Gel ausgeschnitten. Die weitere Bearbeitung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Das Prinzip dieses Kits basiert auf der Verwendung von Silica-Material, an das DNA in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze bindet. Nach zwei Waschschrritten kann die DNA durch Lösungen mit geringen Salzkonzentrationen (z. B. TE) wieder von den Silica-Partikeln eluiert werden.

2.2.7 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm im Photometer. Gemessen wurde außerdem das Verhältnis der OD_{260nm} und der OD_{280nm} , was eine Aussage über eventuelle Proteinkontaminationen in der DNA-Lösung erlaubte. Bei einer proteinfreien Nucleinsäurelösung sollte dieser Wert bei 1,8 bis 2,0 liegen.

Für die Konzentrationsbestimmung kleinerer Mengen an DNA wurde ein Vergleich mit einem Mengenstandard auf einem Agarosegel durchgeführt, bei dem die Nachweisgrenze bei ca. 5 ng DNA pro Bande liegt. Dazu wurde ein kleiner Anteil der Plasmid-DNA zusammen mit einem bestimmten Volumen an DNA bekannter Konzentration (z. B. Smartladder) auf ein Agarosegel gegeben. Die DNA-Konzentration wurde über einen Vergleich der Fluoreszenz-Intensität der Banden unter UV-Licht abgeschätzt.

2.2.8 Arbeiten mit Proteinen

2.2.8.1 *In-vitro*-Translation

Für die *In-vitro*-Translation von mSin3A und der GAL4-ETO- und GAL4-N-CoR-Konstrukte wurde das „TNT® Coupled Reticulocyte System“ der Firma Promega

verwendet. Mit diesem System kann cDNA in Gegenwart aufbereiteter Zellextrakte *in vitro* transkribiert und in Proteine translatiert werden. Die verwendeten Retikulozyten-Lysate enthalten alle Komponenten, die für die Proteinsynthese erforderlich sind, wie z. B. Ribosomen, eine vollständige Mischung von tRNAs, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, Enzyme und Proteinfaktoren für die Initiation, Elongation und Termination der Translation K^+ - und Mg^{2+} -Ionen.

Für die Reaktion wurden folgende Komponenten auf Eis luftblasenfrei zusammenpipettiert:

- 0,5 – 1,0 μg Template-DNA
- 25 μl Retikulozyten-Lysat
- 2 μl TNT[®]-Reaktionspuffer
- 1 μl TNT[®]-RNA-Polymerase (T7)
- 5 μl Aminosäure-Mix ohne Methionin
- 1 μl RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor (40 U/ μl)
- 2 μl ³⁵S-Methionin (>1.000 Ci/mmol; 10 mCi/ml)
- ad 50 μl dH₂O

Die Translation der Proteine erfolgte während einer 90minütigen Inkubation bei 30° C. Aufgrund des Einbaus von ³⁵S-Methionin wurden die Proteine während der Synthese radioaktiv markiert, so daß sie in nachfolgenden Experimenten durch Autoradiographie detektiert werden konnten.

2.2.8.2 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur Expression der GST-ETO-Fusionsproteine (GST = Glutathion-S-Transferase) wurde der Bakterienstamm BL21 (DE3) pLysS, in den die entsprechenden pGEX-Vektoren transformiert wurden, verwendet. 5 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium (100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und 50 $\mu\text{g/ml}$ Chloramphenicol) wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und Ü/N kultiviert (200 rpm, 37° C). Die Übernachtskultur wurde in 300 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium überführt, und bis zu einer $OD_{595\text{nm}}$ von 0,7 – 0,8 kultiviert (200 rpm, 37° C). Die Expression des Fusionsproteins wurde durch Zugabe von IPTG (0,5 mM Endkonzentration) induziert und die Bakterien für weitere 4 ½ hr (200 rpm, 30° C) kultiviert. Dann wurden die Bakterien zentrifugiert (5.000 rpm, 10 min, 4° C) und das Pellet mindestens für 30 min bei –80° C eingefroren. Die gefrorenen Bakterien wurden

in 20 ml LysS-Puffer (50 mM Tris, pH 7,8; 0,4 M NaCl; 0,5 mM EDTA; 10 % [v/v] Glycerin; 0,1 % [v/v] Nonidet P-40) einschließlich Inhibitoren (5 mM β -Mercaptoethanol; 0,5 mM PMSF; 10 μ g/ml Leupeptid; 10 μ g/ml Aprotinin; 10 μ g/ml Benzamidin) und Lysozym (0,2 mg/ml Endkonzentration) resuspendiert, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei RT inkubiert. Dabei wurde die Suspension durch Auf- und Abpipettieren solange gemischt, bis sie viskos wurde. Daran schloß sich ein weiterer Inkubationsschritt für 15 min auf Eis an, wobei die Suspension alle 5 min durch kurzes Schütteln vermischt wurde. Das Lysat wurde dann in einer vorgekühlten Ultrazentrifuge zentrifugiert (45.000 rpm, 30 min, 4° C, VTi 60-Rotor). Alle nachfolgenden Schritte fanden auf Eis bzw. bei 4° C statt, und es wurden nur gekühlte Lösungen (4° C) verwendet. Der Überstand wurde in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt und je nach zu erwartender Ausbeute wurden 2 – 5 ml Glutathion-Agarose (50 %ige Suspension) hinzugegeben. Das Gemisch wurde 1 hr auf einem Drehrad inkubiert; in dieser Zeit konnten die Fusionsproteine über ihren GST-Anteil an die Glutathion-Agarose binden und demzufolge abzentrifugiert werden. Die Glutathion-Agarose-Proteinkomplexe wurden 5 mal mit jeweils 20 ml 0,5 x LysS-Puffer gewaschen und in Anwesenheit von BSA (1 mg/ml) bei 4° C gelagert. Um die Ausbeute an GST-Fusionsprotein zu überprüfen, wurde ein kleines Aliquot auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

2.2.8.3 Herstellung von Zell-Lysaten aus adhärennten Zellen

Zur Gewinnung von Zellextrakten aus 293T-Zellen wurden die Zellen einer konfluenten 10-cm-Gewebekulturschale 48 hr nach Transfektion mit den entsprechenden GAL4-ETO-Konstrukten mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden abgelöst. Die Zellen wurden in 5 ml gekühltem (4° C) PBS resuspendiert, in ein 15- ml-Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (1.500 rpm, 5 min, 4° C). Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellsediment in 500 μ l NETN-Puffer (20 mM Tris, pH 8; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10 % [v/v] Glycerin; 0,5 % [v/v] Nonidet P-40) einschließlich Proteaseinhibitoren (0,5 mM PMSF und Protease-Inhibitoren Cocktail [completeTM: ½ Tablette/5ml NETN]) resuspendiert. Die Zell-Lyse fand während 15minütiger Inkubation auf Eis statt. Nach Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min, 4° C) wurde der proteinhaltige Überstand gesammelt und bei –80° C eingelagert oder direkt zur weiteren Verwendung (Coimmunpräzipitation oder Gelfiltration) eingesetzt.

2.2.8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die meisten Proteine binden SDS in einem konstanten Gewichtsverhältnis. Pro gebundenem SDS-Molekül werden jeweils zwei negative Ladungen zur Gesamtladung beigetragen, so daß es zu einem Ausgleich von Ladungsdifferenzen zwischen unterschiedlichen Proteinen und einer negativen Nettoladung kommt. Deshalb wandern mit SDS komplexierte Moleküle bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichts (MW) zur Anode.

In dieser Arbeit wurde zur Auftrennung von Proteinen das Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffern verwendet. Die dabei verwendeten Gele setzten sich aus einem Trenngel (Tris-Glycin-Puffer, pH 8,8; 5 – 20 % Acrylamid), das mit einem Sammelgel (Tris-Glycin-Puffer, pH 6,8; 3 – 4 % Acrylamid) überschichtet wurde, zusammen. Die Acrylamid-Prozentigkeit des Trenngels richtete sich nach den Molekulargewichten der aufzutrennenden Proteine:

MW < 30 kDa \Rightarrow 15 % Acrylamid

MW 30 – 50 kDa \Rightarrow 12 % Acrylamid

MW 50 – 100 kDa \Rightarrow 10 % Acrylamid

MW > 100 kDa \Rightarrow 8 % Acrylamid

Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isopropanol vollständig entfernt und das Sammelgel über das Trenngel geschichtet. Nachdem auch dieses auspolymerisiert war, wurde das Gel in die Gelkammer eingebaut und diese mit SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 0,1 % [w/v] SDS) aufgefüllt. Die Proteine wurden zur Denaturierung mit der entsprechenden Menge an Auftragspuffer (Roti Load) versetzt und für 3 min bei 95° C gekocht, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 100 V, die nach dem Eintritt der Proteine in das Trenngel auf 150 V erhöht wurde. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde ein Größenstandard (BenchMark prestained protein ladder) mit auf das Gel aufgetragen.

2.2.8.5 Western Blot

Mit Hilfe der Western-Blot-Methode wurden Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Trägermembran übertragen und dort immobilisiert. Dazu wurde das Gel nach erfolgter Auftrennung der Proteine luftblasenfrei auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF)

Membran aufgelegt, die zuvor kurz in 100%igem Methanol aktiviert worden war. Gel und Membran wurden beiderseits mit je zwei Lagen Whatman-Papier versehen, die vorher in Transferpuffer (25 mM Tris-Base; 192 mM Glycin; 20 % [v/v] Methanol) getränkt wurden. In dieser Anordnung wurden sie in eine Mini-Trans-Blot-Kammer (BioRad) eingebaut, die mit gekühltem Transferpuffer gefüllt wurde. Der Transfer der Proteine auf die Membran fand bei 150 mA für 1,5 h statt; die Blot-Kammer wurde während des Transfers auf Eis gestellt.

2.2.8.6 Immunologische Detektion der Proteine

Nach dem Transfer wurde die Membran zunächst zum Absättigen unspezifischer Bindungen für 1 hr bei RT oder Ü/N bei 4° C in Blockierlösung (PBS + 0,1 % (v/v) Tween 20 + 5 % (w/v) Magermilchpulver) inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper nach Angaben des Herstellers. Der anti-ETO-Antikörper (Ab-1) wurde in Blockierlösung auf eine Konzentration von 1,6 µg/ml verdünnt und die Membran darin Ü/N bei 4° C inkubiert. Der anti-Gal4-Antikörper wurde in einer Konzentration von 0,2 µg/ml eingesetzt. In diesem Fall war es ausreichend, die Membran 2 hr bei RT darin zu inkubieren. Der anti-FLAG-Antikörper wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet und die Membran darin 45 min inkubiert. Nach Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper wurde die Membran gründlich mit PBST (PBS + 0,1 % (v/v) Tween 20) gewaschen (3 – 5 mal je 15 min bei RT). Dann wurde sie 30 – 45 min in dem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert. (Bei Verwendung des anti-ETO-Antikörpers wurde als Sekundär-Antikörper ein anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat verwendet, bei anti-Gal4 bzw. anti-FLAG als Primärantikörper eine anti-Maus-IgG-Peroxidase als Sekundär-Antikörper.) Beide sekundären Antikörper wurden unmittelbar vor Gebrauch 1 : 10.000 in Blockierlösung verdünnt. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper wurde die Membran erneut gründlich gewaschen, und im Anschluß konnten die gebildeten Immunkomplexe durch Zugabe von ECL detektiert werden. Durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase kommt es zu einer Oxidation des in der ECL-Lösung enthaltenen Luminols, wodurch Chemilumineszenz erzeugt wird. In einer Expositionskassette wurde der Membran ein photosensitiver Film aufgelegt, auf dem nach der Entwicklung die detektierten Proteine als schwarze Banden erkennbar waren.

2.2.8.7 Coomassie-Färbung

Diese Methode dient der unspezifischen Anfärbung von Proteinen in einem SDS-Polyacrylamidgel. Die anzufärbenden Gele wurden 20 min in Coomassie-Lösung (0,25 % [w/v] Brilliant Blue R; 40 % [v/v] Methanol; 7 % [v/v] Essigsäure) geschwenkt. Dann wurden sie in Entfärbelösung (20 % [v/v] Methanol, 7 % Essigsäure) gelegt, bis der Hintergrund wieder entfärbt war und die Proteine als blaue Banden erkennbar waren. Die Entfärbelösung wurde dabei mehrmals gewechselt.

2.2.8.8 Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen durch Coimmunpräzipitation

Für Coimmunpräzipitationen mit Zell-Lysaten wurden 24 hr vor Transfektion 5×10^6 293T-Zellen in einer 10 cm-Schale ausgesät. Für die Transfektion wurden je 20 μg Plasmid-DNA eingesetzt. 48 hr nach Transfektion wurden die Zellen in NETN-Puffer lysiert (siehe Abschnitt 2.2.8.3) und nach 5minütiger Zentrifugation (13.000 rpm, 4° C) der proteinhaltige Überstand für die Immunpräzipitation eingesetzt: Zu 200 μl Lysat wurde 1 μg Primärantikörper (z. B. anti-mSin3A, anti-FLAG) gegeben und 1 hr bei 4° C präzipitiert. Um die gebildeten Immunkomplexe abzufangen, wurden 40 μl Protein-A/G-Agarose hinzugefügt und der Reaktionsansatz eine weitere Stunde bei 4° C auf einem Drehrad inkubiert. Die Immunkomplexe wurden fünfmal mit NETN-Puffer gewaschen, bevor die präzipitierten Proteine durch 3minütiges Aufkochen in Auftragspuffer (Roti Load) von der Protein-A/G-Agarose eluiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen wurden. Im Anschluß daran wurde ein Western Blot und eine immunologische Detektion mit Antikörpern durchgeführt (siehe Abschnitte 2.2.7.5 und 2.2.7.6).

Für Coimmunpräzipitations-Experimente mit *in vitro* translatierten Proteinen wurde wie folgt verfahren: *In vitro* translatiertes mSin3A-Protein wurde in 50 μl NETN-Puffer mit *in vitro* translatiertem, ^{35}S -markiertem ETO-Protein gemischt und 30 min bei 37° C inkubiert. Die Immunpräzipitation fand während 1stündiger Inkubation bei 4° C in Anwesenheit von 1 μg anti-mSin3A-Antikörper statt. Zum Sammeln der Immunkomplexe wurden 40 μl Protein-A/G-Agarose hinzugegeben, und der Reaktionsansatz eine Stunde bei 4° C auf dem Drehrad inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit NETN-Puffer wurden die Proteine 3 min in Auftragspuffer gekocht und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Das getrocknete Gel wurde einer Autoradiographie unterzogen.

2.2.8.9 Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mittels GST-pull-down Assay

Für die Präzipitation wurden gleiche Mengen an GST-Protein bzw. GST-Fusionsprotein mit einer entsprechenden Menge an *in vitro* translatiertem, ³⁵S-markiertem Protein in einem 100 µl-Ansatz mit PPI-Puffer (50 mM HEPES, pH 7,8; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,02 % [v/v] Nonidet P-40; 0,5 mM PMSF; Protease-Inhibitoren-Cocktail) zusammengegeben und 20 min bei 37° C unter Schütteln inkubiert. Nachdem die Protein-Glutathion-Agarose-Komplexe viermal mit je 1 ml PPI gewaschen worden waren, wurden die Proteine durch 3minütiges Aufkochen in Auftragspuffer (Roti Load) von der Glutathion-Agarose eluiert und anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach dem Trocknen des Gels wurde eine Autoradiographie durchgeführt.

2.2.8.10 Bestimmung des Molekulargewichts hochmolekularer Protein-komplexe mit Hilfe der Größenausschluß-Chromatographie

Je 500 µl Zellextrakt von 293T-Zellen, die mit verschiedenen GAL4-ETO-Deletionskonstrukten transfiziert worden waren, wurden auf eine "Superose 6 HR 10/30" Größenausschlußsäule geladen, um die nativen Molekulargewichte der jeweiligen Proteinkomplexe zu bestimmen. Zuvor wurde die Säule mit Hilfe von Proteinen bekannten Molekulargewichts geeicht. Der Säulenlauf erfolgte in PBS mit 1 mM DTT und einer Flußrate von 0,5 ml/min. Die gesammelten 1ml-Fractionen wurden anschließend im Western Blot auf die Anwesenheit von Protein-Komplexen, die GAL4-ETO-Mutanten beinhalten, untersucht. Dazu wurde ein Antikörper, der gegen die 212 carboxyl-terminalen Aminosäuren von ETO gerichtet ist (anti-ETO, Calbiochem) bzw. ein anti-GAL4-Antikörper verwendet.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Die adhärenenten Zelllinien (293 und 293T) wurden in DMEM einschließlich 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin und 10 % hitzeinaktiviertem FCS (Δ FCS) kultiviert. Alle hier verwendeten Suspensionszelllinien (Kasumi-1, TF-1 und Jurkat) wurden in RPMI 1640 einschließlich 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin und 10 % Δ FCS geführt. Dem Medium der TF-1-Zellen wurde außerdem 3 ng/ml rh-IL-3 zugesetzt. Alle Zellen wurden im Zellkulturbrutschrank bei 37° C gehalten. Zum Passagieren der adhärenenten Zellen wurde zunächst das Medium komplett entfernt, die Zellen einmal mit vorgewärmten (37° C) PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und anschließend durch Zugabe von Trypsinlösung (0,05 % Trypsin; 0,55 mM EDTA, 137 mM NaCl in PBS) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Dabei wurden die Zellen solange bei 37° C unter Trypsin gestellt, bis sie sich durch leichtes Klopfen gegen die Flasche vom Boden ablösten. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe von Medium abgestoppt, die Zellen gezählt und in einer geeigneten Zelldichte wieder in frischem Medium ausgesät. Um die Anzahl der lebenden Zellen einer Probe zu bestimmen, wurden diese in Gegenwart von 0,2 % Trypanblau in einer Zählkammer gezählt, wobei die toten Zellen im Gegensatz zu den lebenden blau angefärbt wurden. Zur Passagierung der Suspensionszellen wurden diese zunächst gezählt und dann in einer für die Zelllinie geeigneten Zellzahl in frischem Medium ausgesät.

Von jeder Zelllinie wurden außerdem Reserven im flüssigen Stickstoff angelegt. Dazu wurden Aliquots à 1 ml mit 1×10^6 Zellen in Δ FCS mit 10 % (v/v) DMSO resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und sofort bei -80° C eingefroren. Nach 24 hr wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank umgelagert, wo sie für viele Jahre eingefroren bleiben können. Das Auftauen der Kryokonserven erfolgte zügig im Wasserbad. Die Zellen wurden zunächst zweimal mit dem entsprechenden Medium gewaschen, um das DMSO zu entfernen und danach in eine T25-Zellkulturflasche überführt. Je nach Wachstum wurden sie nach ein bis zwei Tagen zum ersten Mal passagiert.

2.3.2 Zelllinien

2.3.2.1 293T

Hierbei handelt es sich um eine humane Nierenzelllinie, die aus primärem, embryonalem Nierengewebe etabliert wurde. Die Zellen sind mit dem Adenovirus E1A-Genprodukt transformiert und exprimieren das SV40 "large T" Antigen, was die episodische Replikation von Plasmiden mit SV40-Replikationsursprung und entsprechendem Promotor ermöglicht. Die Zellen wachsen adhären als Monolayer und werden in DMEM mit 10 % Δ FCS kultiviert. Die Verdopplungszeit der Zellen beträgt ca. 20 bis 24 hr, und die konfluente Kultur sollte alle drei bis vier Tage 1 : 5 bis 1 : 10 gesplittet werden. [Graham et al., 1977]

2.3.2.2 Kasumi-1

Kasumi-1-Zellen sind humane myeloische Leukämiezellen, die aus dem peripheren Blut eines 7jährigen Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (FAB M₂) gewonnen wurden. Die Zellen tragen die Translokation (8;21) und exprimieren das AML1/ETO-Fusionsgen. Die runden Zellen wachsen einzeln oder in kleinen Klumpen in Suspension. Sie werden in RPMI mit 10 % Δ FCS kultiviert. Ihre Verdopplungszeit beträgt zwischen 48 und 72 hr. Gesplittet werden die Zellen alle drei Tage 1 : 2 bis 1 : 4, wobei die optimale Zelldichte bei $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml liegt. [Asou et al., 1991]

2.3.2.3 Jurkat

Diese humane T-Zell-Leukämie-Zelllinie wurde aus dem Blut eines 14jährigen Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) etabliert. Ähnlich der Kasumi-1-Zellen handelt es sich auch bei dieser Suspensionszelllinie um runde Zellen, die einzeln oder in kleinen Klümpchen wachsen. Sie werden in RPMI 1640-Medium einschließlich 10 % Δ FCS geführt. Ihre Verdopplungszeit beträgt zwischen 25 – 35 hr. Sie werden alle 2 – 3 Tage 1 : 3 bis 1 : 5 gesplittet und ihre maximale Zelldichte in Kultur liegt bei etwa $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml. [Schneider et al., 1977]

2.3.3 Luziferase-Reporter-Testsystem zur Bestimmung transkriptioneller Repression anhand der Luziferase-Aktivität (*In-vitro*-Repressionstest)

Um die Fähigkeit zur Vermittlung transkriptioneller Repression verschiedener GAL4-ETO-Deletionskonstrukte bestimmen zu können, wurde das in Kapitel 3.1.1 beschriebene Testsystem verwendet. 24 hr vor Transfektion wurden je 600.000 293T-Zellen pro Vertiefung auf gelatinisierten 12-Napf-Platten ausgesät. Die Zellen wurden in Triplikaten mit einem DNA-Gemisch bestehend aus 1 µg des entsprechenden GAL4-ETO-Konstrukts, 1,5 µg des 2xUAS-TK-Luziferase-Reporterplasmids (2xUAS-TK-luc) sowie 0,75 µg eines "Renilla-Luziferase Kontroll-Reportervektors" (Δ prom-Renilla) transfiziert (über Calciumphosphat-vermittelte Transfektion, siehe Abschnitt 2.3.4). 48 hr nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität mit dem "Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System" von Promega (Promega Corporation, Madison, WI, USA) nach Angaben des Herstellers gemessen. Das Prinzip dieses Assay Systems beruht auf der Messung von zwei unterschiedlichen Luziferaseaktivitäten ("Firefly"- und "Renilla"-Luziferasen) aus derselben Probe. Mit der "Firefly"-Luziferase wurde die Promotor-Aktivität des eigentlichen Reporterkonstruktes (2xUAS-TK-luc) nachgewiesen und damit die Auswirkungen der verschiedenen GAL4-ETO-Mutanten auf die Transkription des Reportergens untersucht. Die ermittelte Luziferaseaktivität diente somit als Maß für transkriptionelle Repression bzw. Induktion. Die cotransfizierte "Renilla"-Luziferase verfügte über keinen eigenen Promotor und wurde zur Standardisierung der Transfektionseffizienzen verwendet. Die Messung der Luziferaseaktivitäten erfolgte in zwei nacheinander durchgeführten enzymatischen Reaktionen. Dabei handelte es sich um eine Oxidation des Substrates Luziferin, was zu einer Photonenemission führte, die im Luminometer gemessen werden konnte.

2.3.4 Transiente Calciumphosphat-Transfektion von 293T-Zellen zur Produktion von Virusüberstand

Zur Herstellung viraler Partikel wurden 293T-Zellen verwendet, die mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode transfiziert wurden. Bei dieser Technik entsteht ein feines DNA-Calciumphosphat-Präzipitat, das von den Zellen über Endozytose aufgenommen wird. Um den Zellen alle für die Produktion von Viruspartikeln erforderlichen Gene zur Verfügung zu stellen, müssen sie zusätzlich zu dem retroviralen Vektor noch mit einem

Verpackungskonstrukt und einem Pseudotypisierungskonstrukt transfiziert werden (Abb. 11).

Retroviraler Vektor "PINCO-NC-VP16"



Verpackungskonstrukt "M57"



Pseudotypisierungskonstrukt "GALV"



Abb. 11: Schematische Darstellung der Komponenten des für die Transfektion verwendeten DNA-Mix. Für eine Transfektion wurden je 20 µg des retroviralen Vektors PINCO-NC-VP16, 13 µg des Verpackungskonstruktes M57 [Dorothee von Laer, GSH] und 7 µg des Pseudotypisierungskonstruktes GaLV [Dorothee von Laer, GSH] eingesetzt. LTR = long terminal repeats; P_{CMV} = CMV-Promotor; P_{SV40} = SV40-Promotor; pA = Polyadenylierungssignal; EGFP = "enhanced green fluorescence protein"; EBNA-1 = Epstein-Barr-Kernantigen; GaLV = Gibbon-Leukämie-Virus.

24 hr vor der Transfektion wurden 5×10^6 293T-Zellen einer niedrigen Passage (Passage 4 bis 10) in 8 ml DMEM auf einer gelatinisierten 10cm-Zellkulturschale ausgesät. 10 min vor der Transfektion wurde das Medium gegen 4 ml frisches, Chloroquin-haltiges (25 µM) DMEM ausgetauscht. In der Zwischenzeit wurde das Präzipitat vorbereitet. Dazu wurde in einem 14ml-Falcon-Röhrchen ein 500µl-Ansatz bestehend aus DNA-Mix (20 µg retroviraler Vektor, 13 µg Verpackungskonstrukt M57 und 7 µg Pseudotypisierungskonstrukt GaLV, Abb. 11) und 250 mM CaCl₂ in dH₂O vorgelegt. Zu diesem Ansatz wurden 500 µl 2x HBS (50 mM HEPES; 280 mM NaCl, 10 mM KCl; 12 mM Dextrose; 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,05) langsam hinzugegeben und gleichzeitig durch Ausblasen einer 2ml-Pipette ca. 1 min aufgeschäumt. Das Präzipitat wurde vorsichtig tropfenweise auf den vorbereiteten Zellen verteilt. Nach 8stündiger Inkubation im Brutschrank erfolgte ein Mediumwechsel zu 10 ml DMEM. 24 h später wurde das DMEM zur Sammlung des Virusüberstandes gegen 5 ml RPMI-1640 ausgetauscht. Weitere 24 hr später wurde der Virusüberstand geerntet und durch einen 0,45 µm-Filter filtriert, um eventuell darin vorhandene Zellen zu entfernen.

Danach wurde er direkt zur Transduktion von Zielzellen eingesetzt oder bei -80°C bis zu einer späteren Verwendung gelagert.

2.3.5 Transduktion hämatopoetischer Zellen

Die Transduktion von Kasumi-1- und Jurkat-Zellen wurde in Fibronectin-beschichteten 24-Napf-Platten durchgeführt. Dafür wurden unbeschichtete, nicht Zellkultur-behandelte Platten (Falcon, Katalog-Nr. 1147) verwendet. Um die Platten zu beschichten, wurden in die gewünschte Anzahl von Vertiefungen je $400\ \mu\text{l}$ "RetroNectin"-Lösung (Fibronectin-Fragment CH-296, $50\ \mu\text{g/ml}$) gegeben. Die Platten wurden bei RT unter der Laminar Flow mindestens $2\ \frac{1}{2}$ hr inkubiert, danach wurde die "RetroNectin"-Lösung abgezogen und durch je $1\ \text{ml}$ 2%ige BSA-Lösung zum Blockieren ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von einer halben Stunde wurden die behandelten Vertiefungen noch zweimal mit HBSS gewaschen.

Für die Transduktion wurden pro Ansatz 5×10^6 Zellen in $1\ \text{ml}$ Virusüberstand resuspendiert und in die zuvor beschichtete Vertiefung pipettiert. Die Zellen wurden zusammen mit dem Virusüberstand 90 min bei 32°C und 2.500 rpm zentrifugiert und danach für weitere $4\ \frac{1}{2}$ Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Virusüberstand entfernt und durch RPMI 1640 ersetzt. Die Transduktion wurde an den beiden darauffolgenden Tagen wiederholt. Nach der letzten Transduktionsrunde wurden die Zellen in eine 12-Napf-Platte überführt. 48 - 72 hr nach der letzten Transduktion wurde die Transduktionseffizienz anhand der GFP-Expression mittels Durchflußzytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting; FACS) ermittelt.

2.3.6 Titerbestimmung auf 293T-Zellen mittels FACS-Analyse

Da die verwendeten Pinco-Vektoren neben dem Transgen zusätzlich über einen CMV-Promotor auch EGFP ("Enhanced Green Fluorescence Protein") exprimieren, konnten sowohl Transfektions- als auch Transduktionseffizienz anhand der EGFP-Expression durch FACS-Analyse bestimmt werden. Um eine Aussage über die Infektiosität des Virusüberstandes treffen zu können, wurde dieser auf 293T-Zellen getitert. Dazu wurden 24 hr vor Transduktion je 1×10^5 293T-Zellen pro Vertiefung einer 6-Napf-Platte ausgesät. Der zu titrierende Virusüberstand wurde in Doppelbestimmung in

Zehnerschritten seriell bis zu einer Verdünnung von 10^{-5} verdünnt, mit Polybren (4 µg/ml) versetzt und jeweils 2 ml auf die Zellen gegeben. 24 hr nach Transduktion wurde der Virusüberstand gegen frisches DMEM ausgetauscht. 48 – 72 hr nach Transduktion wurden die Zellen für die FACS-Messung vorbereitet. Dazu wurden sie trypsinisiert und anschließend 1×10^5 bis 5×10^5 Zellen in FACS-Waschlösung (1 % [v/v] Δ FCS; 0,1 % [w/v] Natriumazid in PBS) aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 1.500 rpm, 4° C) wurde der Überstand verworfen und das Zellsediment mit 200 µl FACS-Fixierlösung (1 % [v/v] Formaldehyd in PBS) unter Vortexen fixiert. Der Anteil EGFP-exprimierender Zellen wurde im FACScan (Becton Dickinson, Software CellQuest) bestimmt. Der Virustiter wurde dann folgendermaßen berechnet:

$$\text{Titer [TU/ml]} = \frac{\text{Anteil transduzierter Zellen [\%]}}{100 \%} \times \text{Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \frac{1}{\text{Vol. Virus (ml)}}$$

Die "Zellzahl" bezieht sich auf die Zahl der Zellen zum Zeitpunkt der Zugabe des Virusüberstandes, der "Verdünnungsfaktor" auf den Virusüberstand. Der Titer wird in "Transducing Units per ml" [TU/ml] angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der “Repressor“-Domänen in ETO

3.1.1 Das Testsystem

Um diejenigen Regionen in ETO zu identifizieren, die transkriptionelle Repression vermitteln, wurden verschiedene ETO-Deletionsmutanten konstruiert, die in einem transienten *In-vitro*-Reporter-Testsystem (*In-vitro*-Repressionstest) untersucht wurden. Da ETO selbst nicht an DNA binden kann, wurde es als GAL4-Fusionsprotein eingesetzt. Dazu wurden ETO bzw. die verschiedenen ETO-Mutanten so in den Expressionsvektor pCMX-GAL4 (Abb. 9) kloniert, daß GAL4-ETO-Fusionsgene entstanden (siehe Abschnitt 3.1.2). Daher können die resultierenden Fusionsproteine über die DNA-bindende Domäne von GAL4 (GAL4-DBD) an ein GAL4-abhängiges Reporterkonstrukt binden (2xUAS-TK-luc). Außerdem verfügt das GAL4-Motiv über ein Kernlokalisierungssignal (NLS), so daß die Fusionsproteine im Zellkern exprimiert werden. Das hier verwendete Reporterkonstrukt enthält zwei GAL4-Bindungsstellen (UAS, "upstream activating sequences"), die 5' zu einem Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase-Promotor (HSV-TK-Promotor) liegen. Dieser Promotor steuert die Transkription eines "Firefly"-Luziferase-Gens, dessen Expression in einer enzymatischen Reaktion gemessen wird. Um mit Hilfe dieses Testsystems eine Aussage darüber treffen zu können, ob ein Protein die Transkription aktiviert oder reprimiert, muß zunächst die "basale" Luziferaseaktivität bestimmt werden. Dazu werden die Zellen neben dem Reporterkonstrukt (2xUAS-TK-luc) nur mit dem Vektor pCMX-GAL4 allein transfiziert, der lediglich zur Expression der GAL4-DBD führt (Abb. 12, oben). Da die Expression der GAL4-DBD keine reprimierende Wirkung auf den TK-Promotor hat, können Transkription und Translation der Luziferase ungehindert stattfinden, so daß sich nach Zugabe des Substrates eine hohe Luziferaseaktivität nachweisen läßt. Wird nun aber anstatt der GAL4-DBD in den Zellen ein GAL4-Fusionsprotein exprimiert, das aufgrund von Interaktionen mit Corepressoren transkriptionelle Repression vermittelt, so schlägt sich dies in der nachfolgenden enzymatischen Reaktion in einer reduzierten Luziferaseaktivität nieder (Abb. 12,

unten). Die ermittelte Luziferaseaktivität dient somit als Maß für transkriptionelle Repression bzw. Induktion.

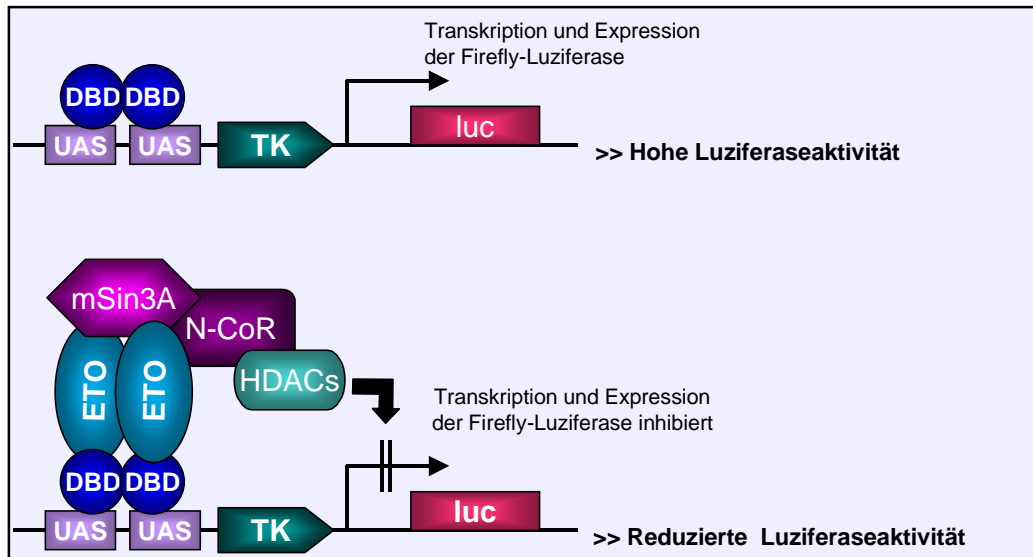


Abb. 12: Schematische Darstellung der Vorgänge im *In-vitro*-Testsystem. DBD = DNA bindende Domäne von GAL4; UAS ("upstream activation sequence") = Bindestellen für GAL4-DBD; TK = Thymidinkinase-Promotor des Herpes simplex Virus; luc = Firefly-Luziferase (*Photinus pyralis*). Erläuterungen im Text.

3.1.2 Konstruktion der GAL4-ETO-Konstrukte

Die für die GAL4-ETO-Fusionsproteine kodierenden Expressionsplasmide wurden generiert, indem die verschiedenen ETO-DNA-Fragmente im Leserahmen mit der GAL4-DBD (Aminosäuren 1 – 147) in den Vektor pCMX-GAL4 (Abb. 9) kloniert wurden. Um die entsprechenden ETO-DNA-Fragmente aus dem Ausgangsvektor pcETO (Abb. 9) herausschneiden zu können, mußten durch Mutagenese-PCR zusätzliche Schnittstellen in dieses Plasmid eingeführt werden. Diese sind in Tab. 3 zusammengefaßt:

| Endkonstrukt GAL4- | generierte Schnittstelle | Position der Schnittstelle | verwendeter 5'-Primer |
|--------------------|--------------------------|----------------------------|---|
| ETO (wt) | <i>Sal</i> I | 1 | 5'-CTCCACAATG <u>GTC</u> GACTCACCTGT-3' |
| ETO Δ 1-236 | <i>Xho</i> I | 234 | 5'-TTTCGTTACCTCGA <u>G</u> AAGCAGCTCT-3' |
| ETO Δ 1-321 | <i>Xho</i> I | 319 | 5'-CCACAGGGACCTC <u>G</u> AGGACAGAAACA-3' |
| ETO Δ 1-401 | <i>Xho</i> I | 399 | 5'-GTACAGTGAC <u>C</u> TCGAGGACTTAAAAA-3' |
| ETO Δ 1-510 | <i>Sal</i> I | 508 | 5'-GCAGGAGGATTCA <u>GTC</u> GACAGTTGCTGGAA-3' |

Tab. 3: Mutagenese-PCRs zur Herstellung der Expressionsplasmide GAL4-ETO und der aminoterminalen Deletionsmutanten GAL4-ETO- Δ 1-236, Δ 1-321, Δ 1-401 und Δ 1-510 aus dem Ausgangsplasmid pcETO.

Die mutagenisierten Plasmide wurden zunächst mit *Xba*I geschnitten, einer Klenow-Reaktion unterzogen und anschließend mit *Sal*I bzw. *Xho*I restringiert. Die so entstandenen *Sal*I-*Xba*I(“blunt“)- bzw. *Xho*I-*Xba*I(“blunt“)-Fragmente wurden dann zwischen die *Sal*I- und *Eco*RV-Schnittstellen von pCMX-GAL4 kloniert. In Abb. 13 ist die Plasmidkarte von pCMX-GAL4-ETO als Beispiel für alle GAL4-ETO-Deletionskonstrukte dargestellt.

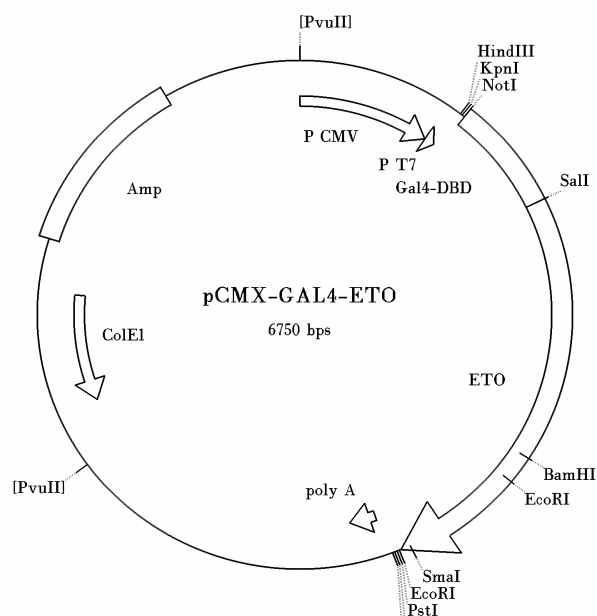


Abb. 13: Plasmidkarte von pCMX-GAL4-ETO. P CMV = CMV-Promotor; P T7 = T7-Promotor; GAL4-DBD = DNA-bindende Domäne von GAL4; poly A = Polyadenylierungssignal; ColE1 = ColE1-Replikationsursprung; Amp = Ampicillin-Resistenz; bps = Basenpaare.

Aus dem Plasmid GAL4-ETO Δ 1-236 wurden anschließend noch zwei weitere Konstrukte mit internen Deletionen generiert. Zu diesem Zweck mußten je zwei *Xba*I-Schnittstellen in dieses Plasmid eingeführt werden (Tab. 4). Die Sequenzen innerhalb dieser Schnittstellen wurden entfernt.

| Endkonstrukt GAL4-ETO | generierte Schnittstellen | Position der Schnittstellen | verwendete 5'-Primer |
|------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|---|
| Δ 1-236 Δ C | a) <i>Xba</i> I b) <i>Xba</i> I | a) 382 b) 430 | a) 5'-CTAAAGCGGTGTC I AGAAGCAGACC-3' b) 5'-GACGCGCGTCT I AGAATTCCTTCAC-3' |
| Δ 1-236 Δ NHR2 | a) <i>Xba</i> I b) <i>Xba</i> I | a) 337 b) 382 | a) 5'-GCATGGCACACGTC I AGAAGAAATGATTG-3' b) 5'-CTAAGCGGTGTC I AGAAGCAGACC-3' |

Tab. 4: Mutagenese-PCRs zur Einführung von je zwei *Xba*I-Schnittstellen in das Plasmid pCMX-GAL4-ETO Δ 1-236 zur Herstellung der Konstrukte pCMX-GAL4-ETO Δ 1-236 Δ C bzw. pCMX-GAL4-ETO Δ 1-236 Δ NHR2.

Fünf weitere GAL4-ETO-Mutanten wurden durch Subklonierung aus bereits existierenden Plasmiden gewonnen (Tab. 5):

| Endkonstrukt | Ausgangsplasmid | Klonierungsschritt |
|------------------------|-------------------------|--|
| GAL4-CRD (N+NHR2+C) | GAL4-ETO Δ 1-236 | Deletion der Sequenz zwischen den beiden <i>Eco</i> RI-Schnittstellen (AS 433 – Carboxy-Terminus) |
| GAL4-NHR2+C | GAL4-ETO Δ 1-321 | Deletion der Sequenz zwischen den beiden <i>Eco</i> RI-Schnittstellen (AS 433 – Carboxy-Terminus) |
| GAL4-N | GAL4-ETO Δ 1-236 | Deletion der Sequenz zwischen der <i>M</i> scl- und <i>Eco</i> RI- Schnittstelle (AS 306 – Carboxy-Terminuns) |
| GAL4-NHR2 | GST-NHR2* | Einbau des <i>Sal</i> I- <i>Hind</i> III(blunt)-Fragments aus GST-NHR2* zwischen <i>Sal</i> I und <i>Eco</i> RV in pCMX-GAL4 |
| GAL4-C | GST-C* | Einbau des <i>Sal</i> I- <i>Hind</i> III(blunt)-Fragments aus GST-C* zwischen <i>Sal</i> I und <i>Eco</i> RV in pCMX-GAL4 |

Tab. 5: Klonierungsstrategie zur Herstellung der Konstrukte GAL4-NHR2+C, GAL4-N, GAL4-NHR2 und GAL4-C. (* Die Beschreibung der Vektoren GST-NHR2 und GST-C erfolgt in Abschnitt 3.2.1.3.)

Zur besseren Übersicht sind alle bisher beschriebenen Konstrukte in der folgenden Abbildung (Abb. 14) zusammengefaßt:

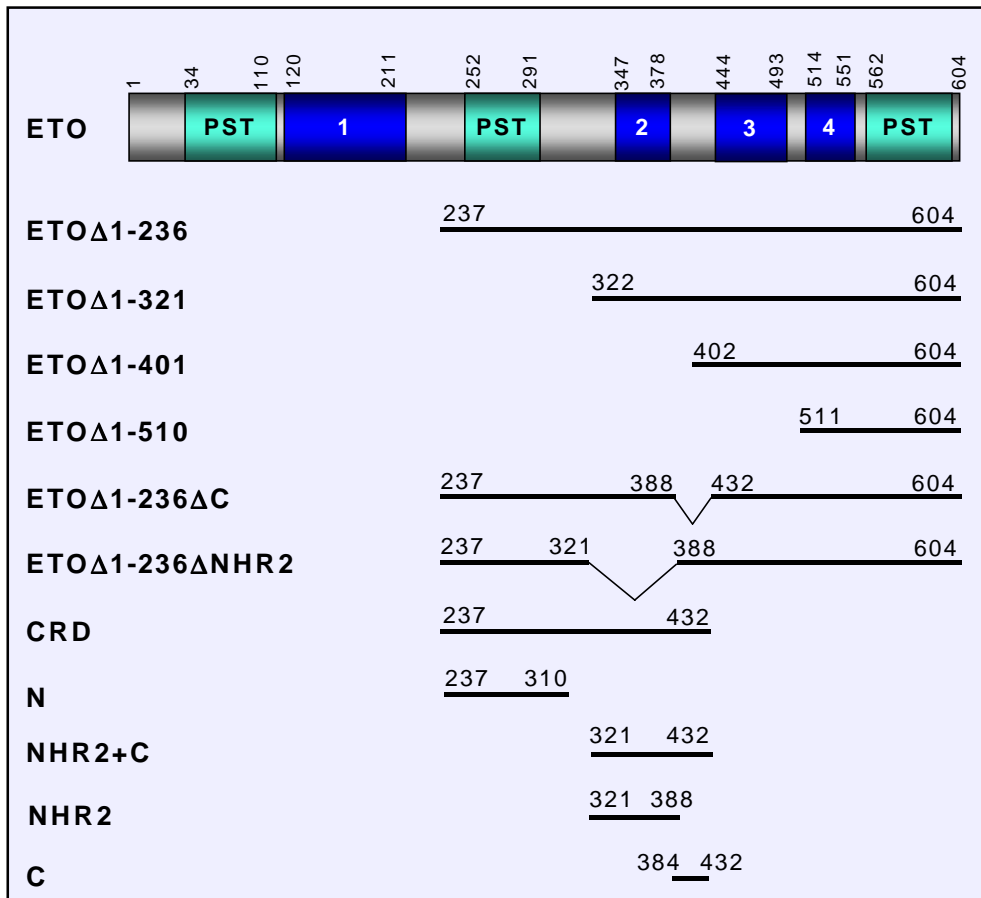


Abb. 14: Zusammenstellung der GAL4-ETO-Deletionskonstrukte. Nicht eingezeichnet ist die GAL4-DBD, die sich jeweils am 5'-Ende der ETO-Fragmente befindet. Die Zahlen über den Konstrukten kennzeichnen die Aminosäuren.

Die Namen der Konstrukte sind folgendermaßen abgeleitet: Bei den oberen vier handelt es sich um aminoternale ETO-Deletionsmutanten, und in den Namen sind jeweils die deletierten Aminosäuren angegeben. Das Symbol "Δ" steht immer für eine Deletion. Der Buchstabe "N" bezeichnet die Aminosäuren 237 – 310 umfassende Region, die sich **N**-terminal von NHR2 befindet. Dementsprechend steht "C" für eine Region, die **C**-terminal an NHR2 grenzt und die Aminosäuren 384 – 432 beinhaltet. „CRD“ bedeutet "**C**ore **R**epressor **D**omain" und umfaßt die Aminosäuren 237 – 432, also die Region N+NHR2+C. Warum die Bezeichnung CRD gewählt wurde, wird später im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus dem *In-vitro*-Repressionstest deutlich.

3.1.3 Funktionelle Untersuchung der ETO-Deletionsmutanten im *In-vitro*-Repressionstest

Um herauszufinden, welche Regionen in ETO transkriptionelle Repression vermitteln, wurden zunächst die aminoterminalen Deletionsmutanten im zuvor beschriebenen Testsystem (Abschnitt 3.1.1) untersucht. Die Ergebnisse sind im folgenden Diagramm (Abb. 15) zusammengefaßt:

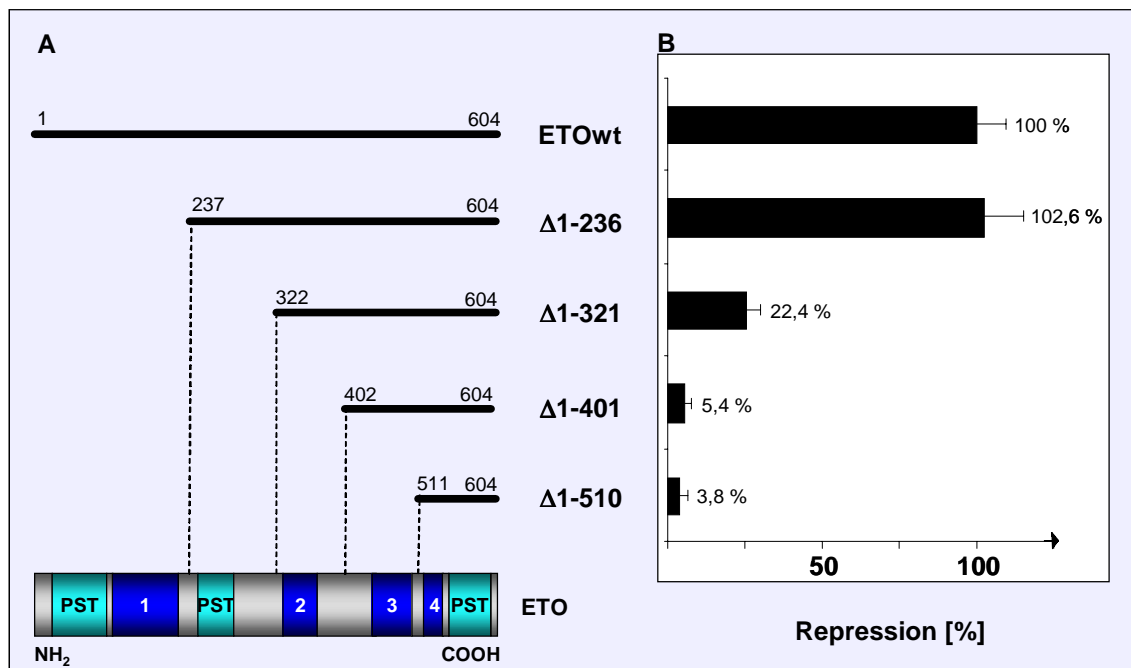


Abb. 15: *In-vitro*-Repressionstest. **A)** Schematische Darstellung der verwendeten GAL4-ETO-Konstrukte. **B)** 293T-Zellen wurden in Triplikaten mit einem Transfektionscocktail bestehend aus 1,5 µg des 2xUAS-TK-luc-Reporterplasmids, 0,75 µg eines promotorlosen Renilla-Luziferaseplasmids (zur Normierung der Transfektionseffizienzen) und 1 µg der angegebenen GAL4-ETO-Deletionsmutanten transfiziert. 48 hr nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität gemessen. Die transkriptionelle Repression der verschiedenen ETO-Mutanten wurde aus fünf unabhängigen Experimenten ermittelt und ist angegeben als % Repression, wobei die durch wt-ETO erzielte Repression gleich 100 % gesetzt wurde.

Das Fusionsprotein GAL4-ETO (GAL4-ETOWt) zeigte eine 80fach reduzierte Luziferaseaktivität im Vergleich zu dem Kontrollplasmid, das nur GAL4 allein exprimiert. Diese Repression wurde gleich 100 % gesetzt und die Repressoraktivität aller anderen Konstrukte im Verhältnis dazu angegeben. Die Deletion der ersten 236 Aminosäuren in ETO (GAL4-ETOΔ1-236), die die erste PST-Region und NHR1 umfaßt, hatte keinen signifikanten Effekt auf die Repressoraktivität (102,6 %). Dies deutet darauf hin, daß der aminoternale Anteil von ETO für die transkriptionelle

Repression nicht erforderlich ist. Die Entfernung von weiteren 85 Aminosäuren führte dagegen zu einer starken Reduktion der Repression auf nur 22,4 %. Diesem Konstrukt (GAL4-ETO Δ 1-321) fehlt neben der ersten PST-Region und NHR1 auch die zweite PST-Region sowie der Bereich zwischen dieser PST-Region und NHR2. Da der Verlust dieser Region eine derart starke Verminderung der Luziferaseaktivität bewirkte, läßt sich daraus schließen, daß diese eine wichtige Rolle in der transkriptionellen Repression spielt. Die Konstrukte GAL4-ETO Δ 1-401 und GAL4-ETO Δ 1-510 verfügten über eine geringe Repressoraktivität von nur 5,4 bzw. 3,8 %.

Um diejenigen Regionen in ETO, die für transkriptionelle Repression essentiell sind, genauer zu charakterisieren, wurden weitere Deletionsmutanten hergestellt, die bereits in Abschnitt 3.1.2 beschrieben worden sind (Tab. 4 + 5). Ausgehend von dem Konstrukt GAL4-ETO Δ 1-236, das in diesem Testsystem maximale Repression erzielte (102,6 %), wurden daher zusätzliche interne und carboxyterminale Deletionen generiert. Diese Konstrukte wurden ebenfalls im *In-vitro*-Repressionstest untersucht (Abb. 16):

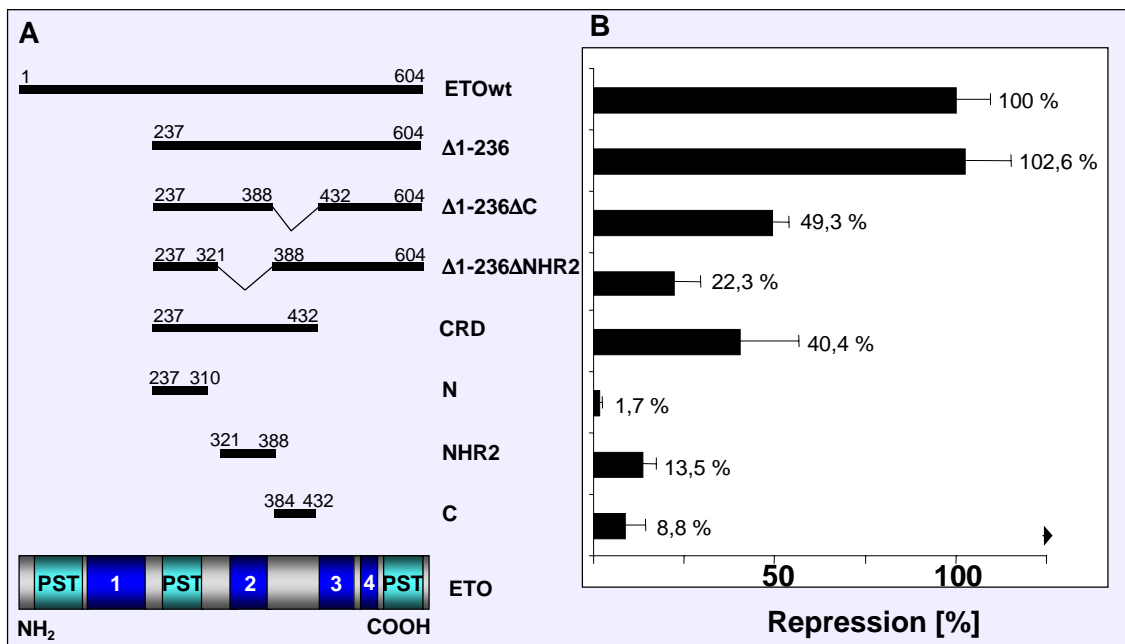


Abb. 16: *In-vitro*-Repressionstest. **A)** Schematische Darstellung der verwendeten GAL4-ETO-Konstrukte. **B)** 293T-Zellen wurden, wie in der Legende zu Abb. 14 beschrieben, transfiziert und 48 hr später wurde die Luziferaseaktivität gemessen. Auch hier ist wieder der Mittelwert aus fünf unabhängigen Experimenten in Relation zur GAL4-ETO-vermittelten Repression, die gleich 100 % gesetzt wurde, angegeben.

Die Deletion der Region zwischen NHR2 und NHR3 (GAL4-ETO Δ 1-236 Δ C; Δ AS 389 - 431) führte zu einer Abnahme der Repression auf 49,3 % im Vergleich zu 102,6 % Repression des Ausgangskonstrukts GAL4-ETO Δ 1-236. Um herauszufinden, welche Rolle NHR2 in der transkriptionellen Repression spielt, wurde diese Domäne vollständig entfernt (GAL4-ETO Δ 1-236 Δ NHR2; Δ AS 321- 387). Dies resultierte in einer starken Verminderung der Repressoraktivität auf nur 22,3 %.

Da diese Daten darauf hin deuten, daß NHR2 sowie daran angrenzende Bereiche offensichtlich für ETO zur Entfaltung seiner maximalen Repressoraktivität erforderlich sind, wurde diese Region weiter untersucht. Das 196 Aminosäuren umfassende Konstrukt GAL-CRD, welches NHR2 sowie die angrenzenden amino- und carboxyterminalen Regionen umfaßt (N+NHR2+C; AS 237 - 432) verfügte über eine Repressoraktivität von 40,4 %. Aufgrund dieser beachtlichen Repressoraktivität und seiner zentralen Lage im ETO-Protein wurde diese Region als "Core Repressor Domain" (CRD) benannt. Einzelne Fragmente der CRD zeigten jedoch nur eine geringe Repressoraktivität. So erzielte ein Fusionsprotein aus GAL4 und einer Region, die zwischen NHR1 und NHR2 liegt (GAL4-N; AS 237 – 306), keine nennenswerte Repression (1,7 %). Auch die Konstrukte GAL4-NHR2 (AS 321 – 388) sowie eine GAL4-Fusion mit der zwischen NHR2 und NHR3 liegenden Region (GAL4-C; AS 384 – 432) zeigten mit 13,5 % bzw. 8,8 % eine geringe Repressoraktivität.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß ETO zur Induktion maximaler Repression alle Regionen bis auf die aminoterminalen 236 Aminosäuren (erste PST-Region und NHR1) benötigt. Dabei handelt es sich bei der CRD, die NHR2 sowie daran angrenzende amino- und carboxyterminale Bereiche einschließt, um das kleinste Deletionskonstrukt, das allein deutliche transkriptionelle Repression vermittelt.

3.2 Identifizierung der ETO-Interaktionspartner

Während sich der vorhergehende Abschnitt (3.1) ausschließlich mit der Charakterisierung der in ETO vorhandenen Repressordomänen beschäftigte, soll im folgenden geklärt werden, warum genau diese Regionen transkriptionelle Repression vermitteln. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob ETO Interaktionen mit anderen Corepressor-Proteinen eingeht und welche Regionen in ETO dafür benötigt werden.

3.2.1 Untersuchung der ETO-N-CoR-Interaktion

Mehrere Arbeitsgruppen haben bereits gezeigt, daß für eine Interaktion zwischen ETO und N-CoR die NHR4-Domäne essentiell ist [Gelmetti et al., 1998; Lutterbach et al., 1998; Wang et al., 1998]. Diese Region (AS 515 – 552 in ETO) verfügt über zwei Cystein-Histidin-reiche Zinkfinger-Motive und über sehr große Homologie zum *Drosophila*-Protein "Nervy". In "Yeast two-hybrid assays" führte die Deletion dieser Domäne in einem GAL4-ETO-Fusionskonstrukt zum Verlust der N-CoR-Interaktion [Lutterbach et al., 1998; Wang et al., 1998]. Auch wenn nur eines der beiden Zinkfinger-Motive entfernt worden war, fand keine Interaktion mit N-CoR mehr statt [Lutterbach et al., 1998; Wang et al., 1998]. Selbst der Austausch einzelner Aminosäuren in einer der beiden Zinkfinger-Motive (C515S oder C535S) verhinderten eine ETO-N-CoR-Interaktion [Lutterbach et al., 1998]. Diese Befunde demonstrierten, daß für eine Interaktion zwischen ETO und N-CoR eine intakte NHR4-Domäne unbedingt erforderlich ist.

Der in dieser Arbeit durchgeführte *In-vitro*-Repressionstest zeigte, daß die beiden GAL4-ETO-Konstrukte, bei denen am meisten vom Amino-Terminus entfernt worden, die NHR4-Domäne jedoch vorhanden war (GAL4-ETO Δ 1-401 bzw. GAL4-ETO Δ 1-510), über eine sehr stark reduzierte Repressoraktivität verfügten (5,4 bzw. 3,8 %, Abb. 15). Daher sollte nun untersucht werden, ob diese beiden Konstrukte in der Lage sind, N-CoR zu binden. Zu diesem Zweck wurde eine *In-vitro*-Protein-Interaktionsanalyse in Form von "GST pull-down assays" durchgeführt (Abschnitt 3.2.1.2).

3.2.1.1 Konstruktion und Expression von GST-ETO-Fusionsproteinen – Teil 1

Um verschiedene ETO-Fragmente als Glutathion-S-Transferase-(GST)-Fusionsproteine exprimieren und aufzureinigen zu können, mußten diese zunächst in den Vektor pGEX-AHK (Abb. 9) kloniert werden. Dieser Vektor verfügt nach der für die GST-Domäne codierenden Sequenz über einen Polylinker, in den die gewünschten ETO-Fragmente so eingebaut wurden, daß der im GST-Anteil vorliegende Leserahmen erhalten blieb und dementsprechend Fusionsgene aus GST und ETO generiert wurden. Um die Konstrukte GST-ETO und GST-NHR4 herstellen zu können, mußten zuerst im Plasmid pcETO über Mutagenese-PCR *Sal*I-Schnittstellen eingefügt werden (Tab. 6).

| Endkonstrukt | generierte Schnittstelle | Position der Schnittstelle | verwendeter 5'-Primer |
|--------------|--------------------------|----------------------------|---|
| GST-ETO (wt) | <i>Sal</i> I | 1 | 5'-CTCCACAATG <u>GTC</u> GACTCACCTGT-3' |
| GST-NHR4 | <i>Sal</i> I | 508 | 5'-GCAGGAGGATTCA <u>GTC</u> GACAGTTGCTGGAA-3' |

Tab. 6: Mutagenese-PCRs zur Herstellung der Fusionskonstrukte GST-ETO und GST-NHR4 aus dem Ausgangsplasmid pcETO.

Die entsprechenden ETO-DNA-Fragmente wurden dann über *Sal*I und *Xba*I aus pcETO herausgeschnitten und zwischen die *Sal*I und *Xba*I-Schnittstellen in den Polylinker des Vektors pGEX-AHK kloniert. Das Konstrukt GST-NHR3+4 wurde generiert, indem die für die Regionen NHR3 bis zum Carboxy-Terminus codierende Sequenz (AS 408 – 604) durch Verwendung der Schnittstellen *Eco*RI und *Xba*I aus pcETO herausgeschnitten und zwischen die entsprechenden Schnittstellen in den Polylinker von pGEX-AHK eingefügt wurde (Tab. 7).

| Endkonstrukt | Ausgangsplasmid | Klonierungsschritt |
|--------------|-----------------|--|
| GST-NHR3+4 | pcDNA3-ETO | Einfügen des <i>Eco</i> RI- <i>Xba</i> I-Fragmentes aus pcDNA3-ETO zwischen die <i>Eco</i> RI- und <i>Xba</i> I-Schnittstellen des Polylinkers in pGEX-AHK |

Tab. 7: Klonierungsstrategie zur Herstellung des Fusionskonstruktes GST-NHR3+4 aus pcETO.

In Abb. 17 ist die Plasmidkarte von GST-ETO als Beispiel für alle GST-ETO-Konstrukte dargestellt:

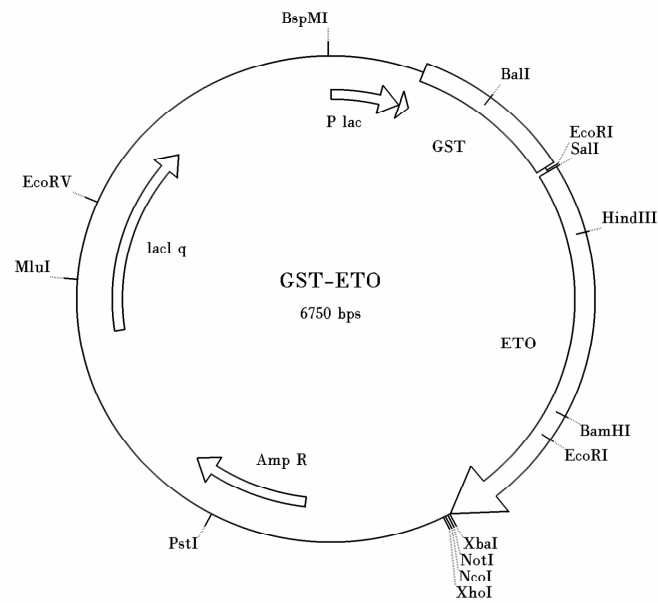


Abb. 17: Plasmidkarte von GST-ETO. P lac = Lac-Promotor; GST = Glutathion-S-Transferase; Amp R = Ampicillin-Resistenzgen; bps = Basenpaare.

Zur Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine GST-ETO, GST-NHR3+4 und GST-NHR4 wurden die entsprechenden Plasmide in den Bakterienstamm "BL21 (DE3) pLysS" transformiert. Dann wurde eine GST-Fusionsprotein-Expression und anschließende Reinigung des Fusionsproteins durchgeführt. Um Qualität und Quantität der Fusionsproteine zu überprüfen, wurde jeweils eine kleine Menge der verschiedenen Proteine in einem SDS-Gel aufgetrennt, welches danach einer Coomassie-Färbung unterzogen wurde (Abb. 18).

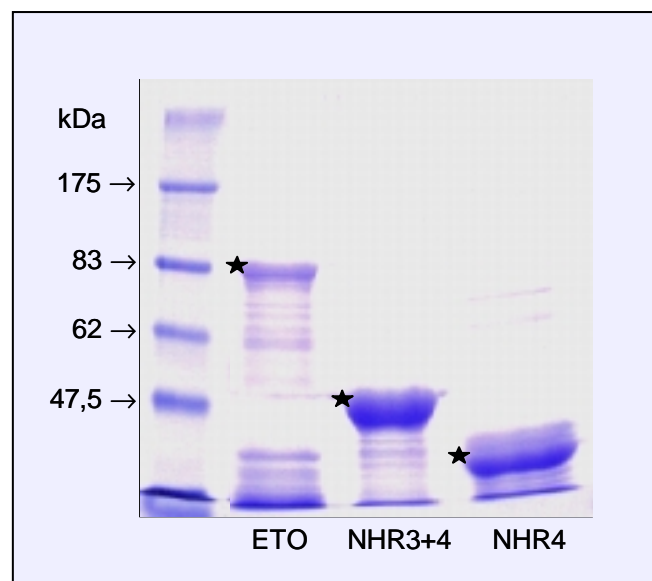


Abb. 18: Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine GST-ETO, GST-NHR3+4 und GST-NHR4 (von links nach rechts). Die entsprechenden Banden sind mit einem Stern markiert. Es wurden jeweils 25 μ l der Proben auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen, das mit Coomassie-Blau gefärbt und getrocknet wurde. Ganz links wurde ein Molekulargewichtsstandard als Größenmarker mitaufgetragen.

Da der GST-Anteil der Fusionsproteine über ein Molekulargewicht von 26 kDa verfügt, ergeben sich für die verschiedenen Fusionsproteine folgende Molekulargewichte: GST-NHR4 ca. 37 kDa, GST-NHR3+4 ca. 46 kDa und GST-ETO ca. 90 kDa. Da größere Proteine während des Aufreinigungsprozesses im allgemeinen einem stärkeren Abbau durch Proteinase ausgesetzt sind, schlägt sich dies meist in einer geringeren Ausbeute nieder. So war auch bei dieser Aufreinigung die Menge an GST-ETO deutlich geringer als die der beiden kleineren Proteine GST-NHR3+4 und GST-NHR4. Für die nachfolgenden "GST pull-down"-Experimente wurden deshalb die Fusionsproteine GST-NHR3+4 und GST-NHR4 mit Glutathion-Agarose so verdünnt, daß in einem definierten Volumen deren Menge der an GST-ETO entsprach.

3.2.1.2 “GST pull-down“-Versuche – Teil 1

Um herauszufinden, ob es *In-vitro*-Interaktionen zwischen den in Abschnitt 3.2.1.1 beschriebenen GST-ETO-Fusionsproteinen und dem nuklearen Rezeptor Corepressor N-CoR gibt, wurden verschiedene “GST pull-down“-Versuche durchgeführt. Bereits nachgewiesen wurde eine Interaktion zwischen ETO und einem humanen N-CoR-Fragment, das die Aminosäuren 988 bis 1816 umfaßt [Wang et al., 1998] (Abb. 19, A). Deshalb wurde in dieser Arbeit zunächst ein N-CoR-Fragment verwendet, das zwar etwas kleiner als das von Wang et al. ist, aber ebenfalls den zentralen Bereich von N-CoR und damit auch die Repressor-Domäne III (R III) umspannt (N-CoR 970 – 1502; Abb. 19, A + B).

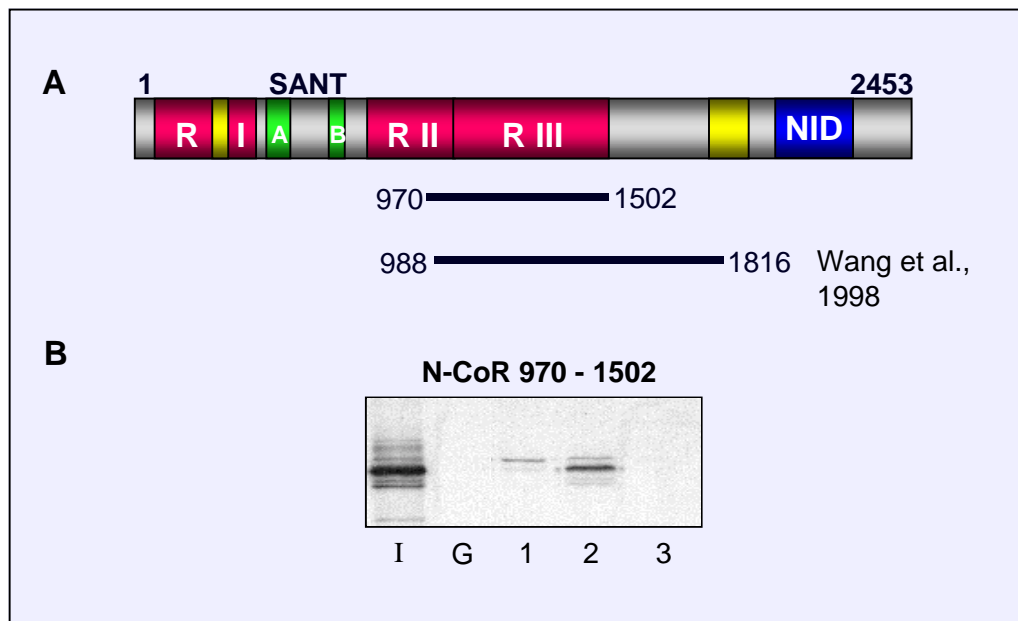


Abb. 19: “GST pull-down“-Experiment. **A)** Schematische Darstellung des 2453 AS großen humanen N-CoR-Proteins (huN-CoR) und des im Versuch verwendeten GAL4-N-CoR970-1502-Konstrukts [Heinzel et al., 1997] im Vergleich zu dem von Wang et al. eingesetzten Konstrukt. RI, RII und RIII bezeichnen die Repressor-Domänen I, II und III, SANT A und B die SANT-Domänen A und B. NID bedeutet “nuclear interacting domain“. **B)** GAL4-N-CoR 970 – 1502 wurde *in-vitro* translatiert, ³⁵S-markiert und mit gleichen Mengen an GST, GST-ETO, GST-NHR3+4 oder GST-NHR4 inkubiert. Nach extensivem Waschen wurden die präzipitierten Proteine in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt, das danach einer Autoradiographie unterzogen wurde. Die Abkürzungen unter den Spuren bedeuten: I = Input (10 % der Menge an GAL4-N-CoR-Protein, die in den “Pull-down“-Reaktionen eingesetzt wurde); G = GST; 1 = GST-ETO; 2 = GST-NHR3+4; 3 = GST-NHR4.

Wie in Abb. 19 B (Spur 2) zu erkennen ist, konnte mit GST-NHR3+4 eine deutliche Menge an GAL-4-N-CoR (970 – 1502) präzipitiert werden, was bedeutet, daß die beiden Proteine aneinander gebunden haben. Dagegen fand keine Interaktion zwischen GST-NHR4 und N-CoR statt (Spur 3). Als Positivkontrolle wurde ein "Pull-down" mit GST-ETO (Spur1) durchgeführt. Allerdings konnte damit nur eine geringe Menge an N-CoR-Protein präzipitiert werden. Dies könnte möglicherweise mit einer schlechteren Qualität des GST-ETO-Proteins im Vergleich zu GST-NHR3+4 zu erklären sein, denn - wie schon erwähnt - erliegen größere Proteine einem schnelleren Abbau. Die Tatsache, daß das Fusionsprotein GST-NHR3+4 in der Lage war, N-CoR zu binden, das entsprechende Konstrukt (GAL4-NHR3+4) im Repressionstest aber nur über eine geringe Repressoraktivität verfügte (5,4 %; Abb. 15, B), läßt schließen, daß die Bindung an N-CoR allein nicht ausreichend ist, um deutliche transkriptionelle Repression zu vermitteln. Vielmehr sieht es danach aus, daß mehrere Regionen in ETO miteinander kooperieren, um maximale Repression zu induzieren und daß dafür noch andere Corepressoren erforderlich sind. Welche Rolle dabei die Sin3-Proteine spielen, wird später noch untersucht werden (Abschnitt 3.2.2).

Um zunächst die ETO-Bindungsstelle in N-CoR weiter eingrenzen zu können, wurden noch zusätzliche "Pull-down"-Versuche durchgeführt, und zwar mit kleineren GAL4-N-CoR-Fragmenten (Abb. 20 A + B). Als GST-Fusionsprotein wurde dabei GST-NHR3+4 verwendet, da mit diesem im vorhergehenden Experiment die größte Menge an N-CoR-Protein präzipitiert werden konnte.

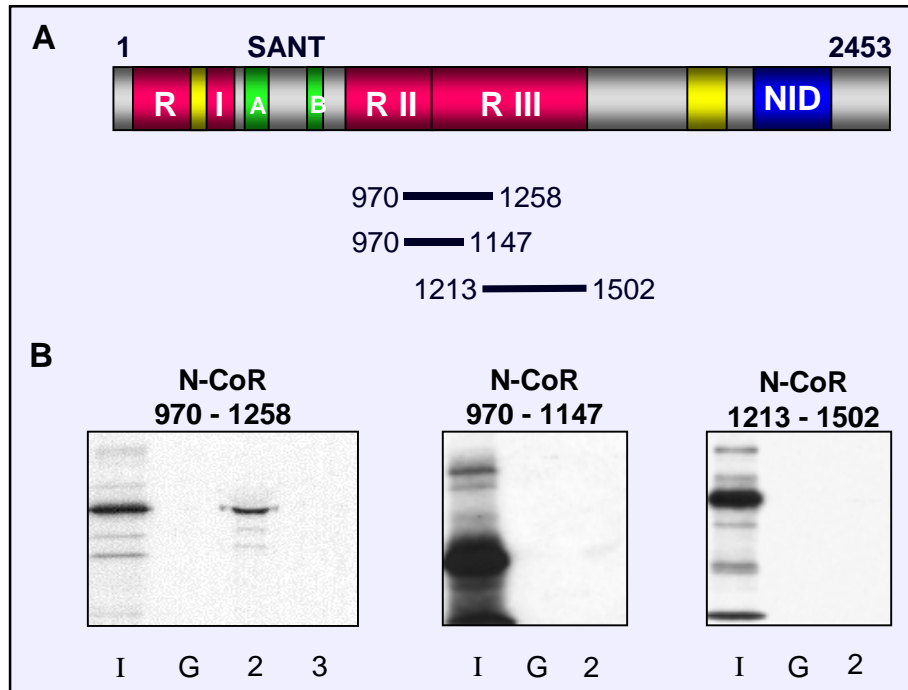


Abb. 20: "GST pull-down"-Experiment. **A)** Schematische Darstellung des humanen N-CoR-Proteins und der im Versuch verwendeten GAL4-N-CoR-Konstrukte. **B)** Die in A gezeigten GAL4-N-CoR-Konstrukte wurden *in-vitro* translatiert, ^{35}S -markiert und mit gleichen Mengen an GST, GST-NHR3+4 bzw. GST-NHR4 inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die präzipitierten Proteine in einem 10%igen SDS-Gel aufgetrennt. Das getrocknete Gel wurde einer Autoradiographie unterzogen. I = Input; G = GST; 2 = GST-NHR3+4; 3 = GST-NHR4.

Die oben stehende Abbildung (Abb. 20, B) zeigt, daß GAL4-N-CoR 970 – 1258, nicht aber das kleinere, die Aminosäuren 970 – 1147 umfassende Fragment, durch GST-NHR3+4 präzipitiert werden konnte. Auch ein weiter carboxyterminal lokalisiertes Fragment (GAL4-N-CoR 1213 – 1502) konnte nicht präzipitiert werden. Aus diesen Daten läßt sich daher schließen, daß die Aminosäuren 1147 – 1213 in N-CoR für eine Interaktion mit ETO notwendig sind. Außerdem bestätigte der mit GAL4-N-CoR 970 – 1258 durchgeführte "Pull-down" den Befund, daß GST-NHR3+4, nicht aber GST-NHR4 in der Lage ist, N-CoR zu binden (Abb. 20 B, links).

3.2.1.3 Konstruktion und Expression von GST-ETO-Fusionsproteinen – Teil 2“GST pull-down“-Versuche – Teil 2

Um zu untersuchen, ob eventuell eine weitere N-CoR-Bindungsstelle im zentralen Teil von ETO vorhanden ist, wurden zusätzliche GST-ETO-Fusionskonstrukte generiert und anschließend exprimiert. Die dafür benötigten ETO-Sequenzen wurden über PCR aus pcETO amplifiziert, wobei in die 5'-Primer jeweils eine *Xba*I- und in die 3'-Primer je eine *Hind*III-Schnittstelle eingeführt wurde (Tab. 8). Die mit *Xba*I und *Hind*III restringierten PCR-Produkte wurden dann in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors pGEX-AHK (Abb. 9) ligiert.

| Endkonstrukt | umfassende Region (AS) | PCR-Primer |
|--------------|------------------------|---|
| GST-N | 234 – 327 | 5'-CGCTCTAGACTCGATGTGAACGAAAACGGG-3' 5'-CGTCCC AAGCTT GTTTCTGTCCCTGAGGTCCCT-3' |
| GST-N+NHR2 | 234 – 388 | 5'-CGCTCTAGACTCGATGTGAACGAAAACGGG-3' 5'-CGTCCC AAGCTT CAATTCTTCCCGGTCTGC-3' |
| GST-NHR2 | 321 – 388 | 5'-CGCTCTAG AAGGG ACCTCAGGGACAGAAAC-3' 5'-CGTCCC AAGCTT CAATTCTTCCCGGTCTGC-3' |
| GST-NHR2+C | 321 – 432 | 5'-CGCTCTAG AAGGG ACCTCAGGGACAGAAAC-3' 5'-CGTCCC AAGCTT GAATTCCCGATGCGCGTCTAG-3' |
| GST-C | 384 – 432 | 5'-CGCTCTAGAGCAGACCGGGAAGAATTG-3' 5'-CGTCCC AAGCTT GAATTCCCGATGCGCGTCTAG-3' |

Tab. 8: Verwendete PCR-Primer zur Amplifizierung der ETO-Fragmente N, N+NHR2, NHR2, NHR2+C und C aus pc-ETO. Die in den Primer vorhandenen *Xba*I-Schnittstellen sind unterstrichen, die *Hind*III-Schnittstellen fett gedruckt.

Die Konstrukte wurden in den Bakterienstamm "BL21 (DE3) pLysS" transformiert und anschließend als GST-Fusionsproteine exprimiert und aufgereinigt (Abb. 21 A). Danach wurden sie im "Pull-down"-Experiment auf ihre Interaktion mit Flag-N-CoR getestet (Abb. 21 B). Das dafür verwendete Konstrukt codiert für die Aminosäuren 970 – 2453 von N-CoR, und am Amino-Terminus befindet sich ein Flag-Epitop.

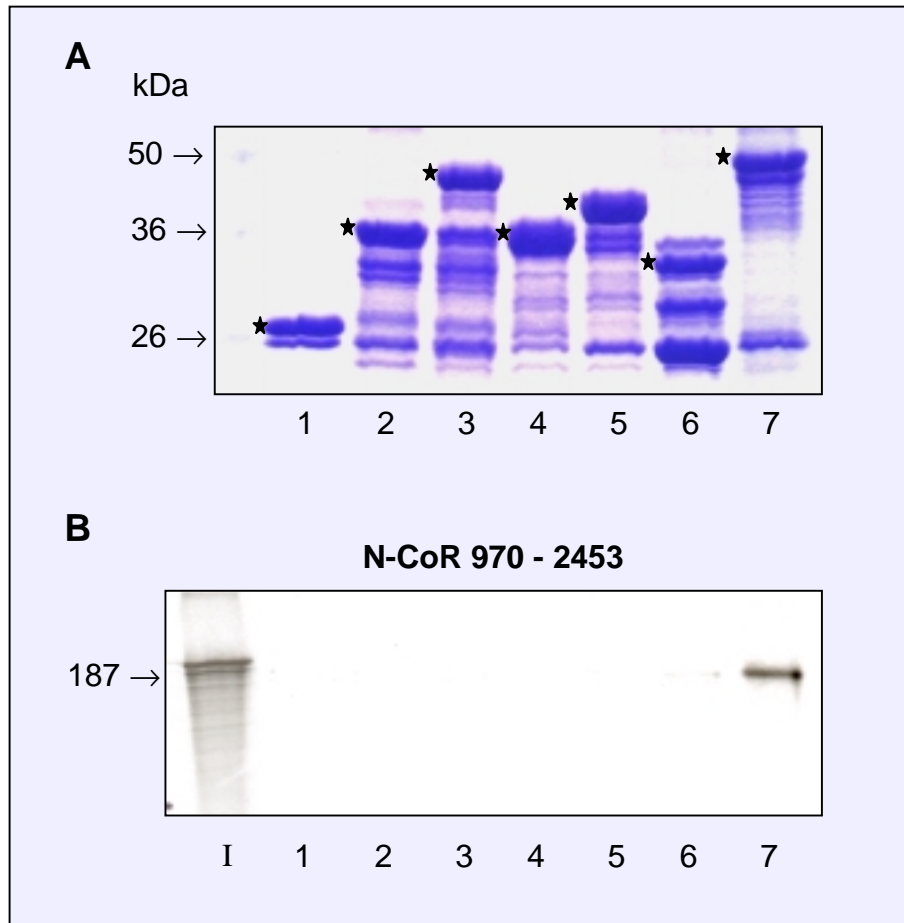


Abb. 21: **A)** Expression und Aufreinigung von GST-ETO-Fusionsproteinen. Es wurden jeweils 30 μ l der entsprechenden Proben auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen, das mit Coomassie-Blau gefärbt und danach getrocknet wurde. Auftragschema: ganz links = Molekulargewichtsstandard; 1 = GST (~ 26 kDa); 2 = GST-N (~36 kDa); 3 = GST-N+NHR2 (~43 kDa); 4 = GST-NHR2 (~33 kDa); 5 = GST-NHR2+C (~38 kDa); 6 = GST-C (~31 kDa); 7 = GST-NHR3+4 (~46 kDa). Die entsprechenden Banden sind mit einem Stern gekennzeichnet. Bei einigen Proben wurde bereits BSA zum Blockieren hinzugesetzt. **B)** "GST pull-down"-Experiment. Das Konstrukt FLAG-N-CoR wurde *in-vitro* translatiert, 35 S-markiert und in Kombination mit den in A gezeigten GST-ETO-Fusionsproteinen auf Interaktionen getestet. I = Input; 1 – 7 analog A.

Mit GST-NHR3+4 ließ sich das *in vitro* translatierte Flag-N-CoR-Protein präzipitieren (Abb. 21 B), was die Resultate der beiden vorhergehenden "Pull-down"-Experimente bestätigte. Bei keinem der anderen getesteten GST-ETO-Konstrukte war eine Interaktion mit Flag-N-CoR festzustellen. Zusammenfassend haben die in diesem Abschnitt (3.2.1) vorgestellten Versuche gezeigt, daß sich im carboxyterminalen Bereich von ETO eine Bindungsstelle für das Corepressor-Protein N-CoR befindet. Allerdings war für diese Bindung entgegen der in der Literatur publizierten Daten [Lutterbach et al., 1998; Wang et al., 1998] die NHR4-Domäne allein nicht ausreichend, sondern erforderte zusätzlich die Anwesenheit von NHR3.

3.2.2 Untersuchung der ETO-mSin3A-Interaktion

Nachdem also die N-CoR-Bindungsstelle auf den Carboxy-Terminus von ETO (NHR3+4) kartiert wurde, dienten die folgenden Versuche dazu, die Interaktionen zwischen ETO und einem anderen Corepressor, mSin3A, zu untersuchen. Dies wurde in Form von Coimmunpräzipitationsexperimenten mit *in vitro* translatierten Proteinen und "*in vivo*" mit Zellextrakten durchgeführt. Die folgende Abbildung (Abb. 22) zeigt die Ergebnisse aus den *In-vitro*-Versuchen.

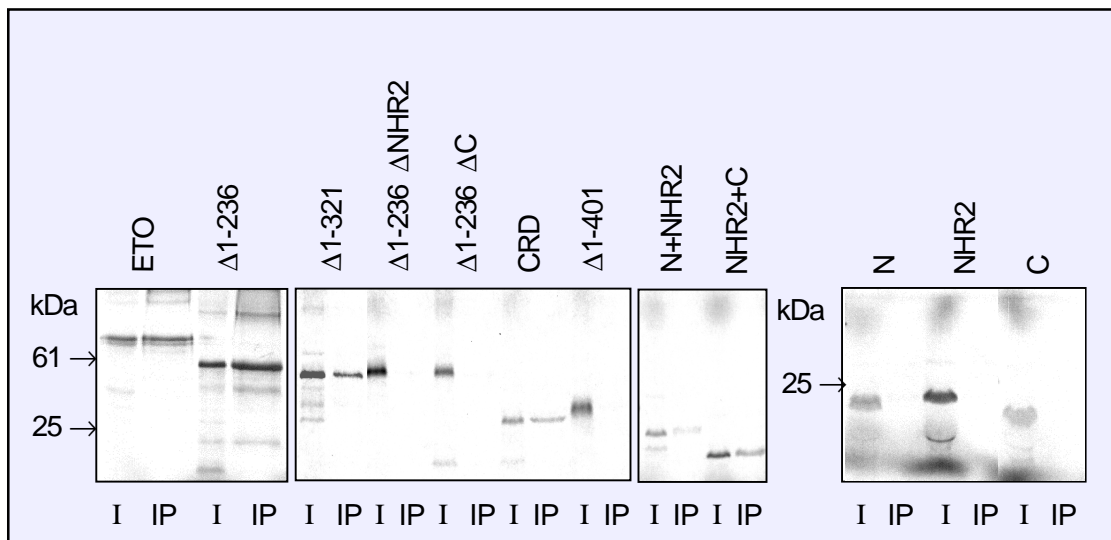


Abb. 22: Coimmunpräzipitation. *In vitro* translatiertes mSin3A-Protein wurde mit verschiedenen *in vitro* translatierten, ^{35}S -markierten GAL4-ETO-Mutanten inkubiert und dann mit einem α -mSin3A-Antikörper immunpräzipitiert. Nach intensivem Waschen wurden die präzipitierten Proteine (Spuren IP) zusammen mit je 10 % des entsprechenden Input-Materials (Spuren I) auf SDS-Gelen aufgetrennt, die nach dem Trocknen einer Autoradiographie unterzogen wurden.

Der gegen mSin3A gerichtete Antikörper präzipitierte nicht nur GAL4-ETOWt, sondern auch aminoterminal und carboxyterminal deletiertes ETO (GAL4-ETO Δ 1-236 bzw. GAL4-CRD; Abb. 22), was darauf hindeutet, daß die mSin3A-Bindungsstelle im Bereich der CRD lokalisiert ist. Interne Deletionen innerhalb der CRD (GAL4-ETO Δ 1-236 Δ NHR2 bzw. GAL4-ETO Δ 1-236 Δ C) führten dementsprechend zum Verlust der Interaktion. Eine aminoterminal Verkürzung um weitere 85 Aminosäuren im Konstrukt GAL4-ETO Δ 1-321 resultierte in einer schwächeren mSin3A-Bindung und bei einem Konstrukt, bei dem noch 80 zusätzliche aminoterminal Aminosäuren deletiert wurden (GAL4-ETO Δ 1-401), zeigte sich überhaupt keine Interaktion mehr. Ebenso konnte keine mSin3A-Copräzipitation mit ETO-Deletionsmutanten nachgewiesen werden, die

nur den aminoterminalen (GAL4-N) oder den carboxyterminalen (GAL4-C) Anteil der CRD beinhalteten. Auch die NHR2-Domäne (GAL4-NHR2) allein war nicht ausreichend, um mSin3A zu binden. Jedoch zeigten ETO-Mutanten, die über NHR2 und entweder die angrenzende aminoternimale Region (GAL4-N+NHR2) oder den benachbarten carboxyterminalen Bereich (GAL4-NHR2+C) verfügten, eine schwache Interaktion mit mSin3A. Diese Ergebnisse wurden durch Coimmunpräzitationsversuche mit Zellextrakten, die aus transfizierten 293T-Zellen hergestellt wurden, bestätigt (Abb. 23).

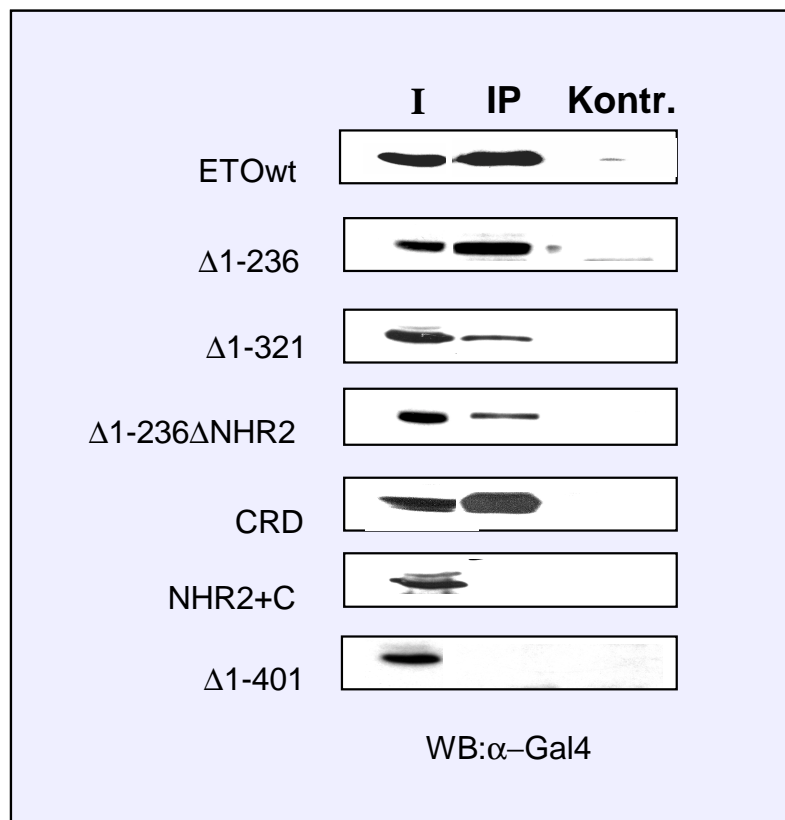


Abb. 23: Coimmunpräzitation. 293T-Zellen wurden mit den angegebenen GAL4-ETO-Konstrukten transfiziert, und 48 hr nach Transfektion wurden Zell-Lysate hergestellt. Endogenes mSin3A-Protein wurde mit einem α-mSin3A-Antikörper (Spuren IP) oder als Negativ-Kontrolle mit Protein-A/G-Agarose allein (Spuren Kontr.) immunpräzitiert. Die präzitierten Proteine wurden zusammen mit 5 % des Input-Materials (Spuren I) in einem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran transferiert. Die copräzitierten GAL4-ETO-Proteine wurden im Western Blot (WB) mit einem Antikörper, der gegen die DNA-bindende Domäne von GAL4 gerichtet ist, (α-Gal4) detektiert.

Alle GAL4-ETO-Mutanten, die die CRD beinhalteten, konnten mit einem Antikörper gegen mSin3A copräzipitiert werden. Dabei handelte es sich bei GAL4-ETO, GAL4-ETO Δ 1-236 und GAL4-CRD um starke Interaktionen, bei denen 10 – 20 % des eingesetzten ETO-Proteins copräzipitiert wurde. Im Gegensatz dazu konnte vergleichsweise wenig ETO-Protein (ca. 1 – 2 % des Inputs) mit dem α -mSin3A-Antikörper aus Zellextrakten copräzipitiert werden, die ETO-Mutanten beinhalteten, bei denen ein Teil der CRD deletiert war (GAL4-ETO Δ 1-236 bzw. GAL4-ETO Δ 1-236 Δ NHR2). Überhaupt keine Interaktion fand statt zwischen mSin3A und den Proteinen, die über NHR2 und die benachbarte carboxyterminale Region (GAL4-NHR2+C) bzw. über die NHR3- und NHR4-Domänen (GAL4-ETO Δ 1-401) verfügten. Diese Daten zeigen, daß für eine Interaktion mit mSin3A die CRD erforderlich ist.

In den beiden nachfolgenden Experimente sollte zum einen die ETO-Bindungsstelle in mSin3A kartiert werden (Abb. 24 B) werden, zum anderen sollte überprüft werden, ob mSin3B ebenfalls mit der CRD in ETO interagieren kann (Abb. 24 C).

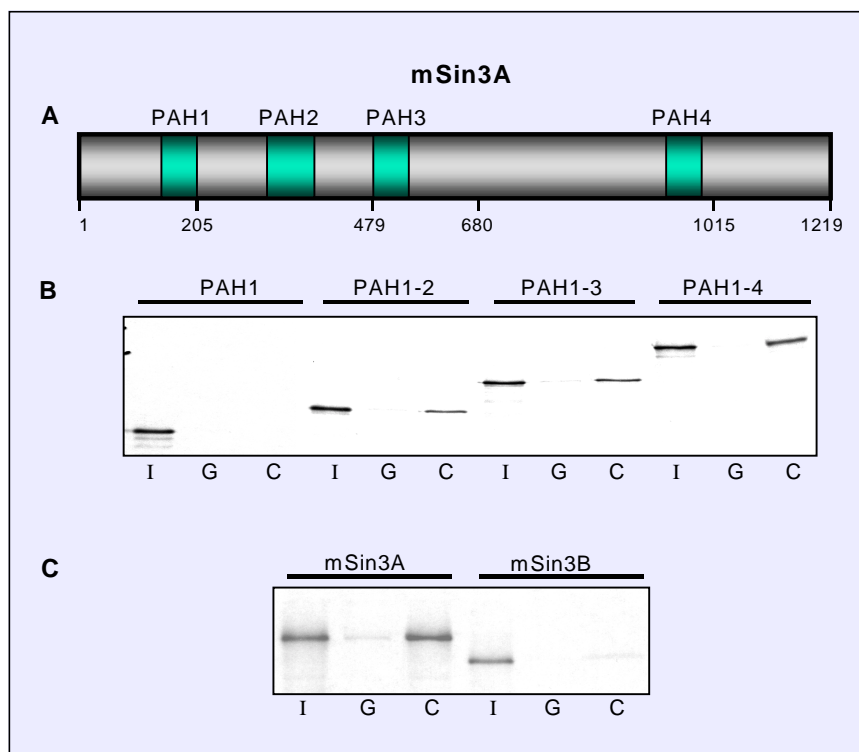


Abb. 24: “GST pull-down“-Experimente. **A)** Schematische Darstellung des 1219 Aminosäuren großen mSin3A-Proteins. PAH = “paired amphipathic helix“. **B)** “GST pull-down“-Experiment. Die angegebenen mSin3A-Domänen wurden *in vitro* translatiert, ^{35}S -markiert, und mit GST allein oder GST-CRD inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die präzipitierten Proteine zusammen mit 10 % des Inputs in einem SDS-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. **C)** “GST pull-down“-Experiment mit *in vitro* translatiertem, ^{35}S -markiertem mSin3A bzw. mSin3B. I = Input, G = GST, C = GST-CRD. Diese Experimente wurden von Jens Tiefenbach durchgeführt.

In der oben stehenden Abbildung (Abb. 24 B) ist zu erkennen, daß die mSin3A-Deletionsmutante, die die aminoterminalen 205 Aminosäuren umfaßt und die PAH1-Domäne beinhaltet (PAH1, "paired amphipathic helix 1"), nicht in der Lage war, an die CRD von ETO zu binden. Zwischen der nächst größeren mSin3A-Mutante (PAH1-2, AS 1 – 479) und GST-CRD war jedoch eine Interaktion zu erkennen. Diese Interaktion zeigte sich erwartungsgemäß auch zwischen GST-CRD und den beiden größten mSin3A-Fragmenten PAH1-3 (AS 1 – 680) bzw. PAH1-4 (AS 1 – 1015). Daraus läßt sich schließen, daß in mSin3A die zwischen den Aminosäuren 205 und 479 liegende Region, in der sich die PAH2-Domäne befindet, für eine Interaktion mit ETO erforderlich ist. Ein weiteres Mitglied der Sin3-Familie, mSin3B, konnte im Gegensatz zu mSin3A im "GST pull-down"-Versuch nicht mit GST-CRD präzipitiert werden (Abb. 24, C). Ob sich möglicherweise in einer anderen Region in ETO eine Bindungsstelle für mSin3B befindet, wurde in diesem Zusammenhang nicht untersucht.

Zusammenfassend haben die in diesem Abschnitt (3.2.2) gezeigten Versuche ergeben, daß für eine effiziente ETO-mSin3A-Interaktion eine intakte "Core repressor"-Domäne vorhanden sein muß. Dies wurde sowohl mit *in vitro* translatierten Proteinen (Abb. 22) als auch durch Coimmunpräzipitation mit Zellextrakten (Abb. 23) nachgewiesen. Die ETO-Bindungsstelle wurde in mSin3A auf die PAH2-Domäne kartiert (Abb. 24 B). Eine Interaktion zwischen mSin3B und der CRD konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. 24 C).

3.3 Untersuchung der ETO-Homodimerisierung

In der Literatur wurde bereits beschrieben, daß die NHR2-Domäne für die Homo- und Heterodimerisierung zwischen ETO und anderen Mitgliedern der ETO-Familie, wie z. B. MTGR1, erforderlich ist [Kitabayashi et al., 1998]. Die Fähigkeit, mit anderen ETO-Proteinen dimerisieren zu können, hat mit großer Wahrscheinlichkeit auch Einfluß auf die Repressoraktivität des Proteins. Da Entfernung der amino- oder carboxyterminalen Sequenzen innerhalb der CRD zu einer Verminderung der Repressoraktivität führte, wurde im folgenden untersucht, ob bei diesen Mutanten die NHR2-vermittelte Homodimerisierung gestört war (Abb. 25).

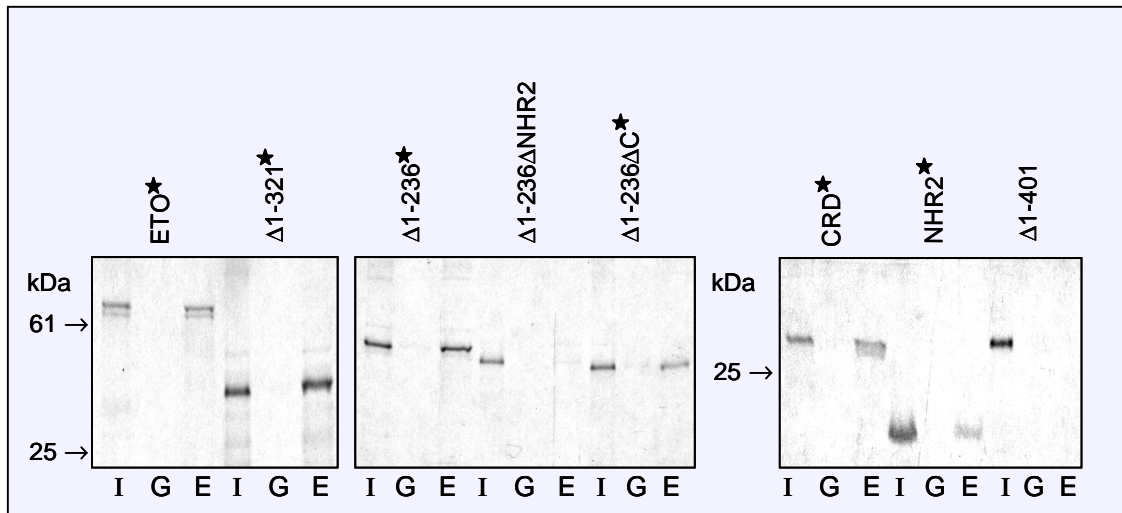


Abb. 25: "GST pull-down"-Experiment zur Untersuchung der NHR2-vermittelten Homodimerisierung. Die verschiedenen GAL4-ETO-Deletionskonstrukte wurden *in vitro* translatiert, ^{35}S -markiert und mit GST allein (Spuren G) bzw. GST-ETO (Spuren E) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden sie zusammen mit 10 % des eingesetzten Input-Materials (Spuren I) in SDS-Gelen aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert. Zur besseren Übersicht sind Konstrukte, die die NHR2 beinhalten, mit einem Stern markiert.

Erwartungsgemäß konnten ETOwt sowie alle ETO-Mutanten, die über die NHR2-Domäne verfügten (GAL4-ETO Δ 1-236, GAL4-ETO Δ 1-321, GAL4-ETO Δ 1-236 Δ C, GAL4-CRD und GAL4-NHR2) im "Pull-down" mit GST-ETO präzipitiert werden (Abb. 25). Im Gegensatz dazu waren Mutanten, bei denen die NHR2 fehlte (GAL4-ETO Δ 1-236 Δ NHR2 und GAL4-ETO Δ 1-401), nicht in der Lage, an GST-ETO zu binden. Dies bestätigte, daß die Struktur der NHR2 in den hier verwendeten Konstrukten intakt war. Die Tatsache, daß das Konstrukt GAL4-ETO Δ 1-321 trotz Fähigkeit zur Homodimerisierung nur über eine relativ geringe Repressoraktivität verfügte, läßt vermuten, daß die durch ETO vermittelte Repression nur teilweise von der intakten Helixstruktur der NHR2-Domäne abhängt. Dagegen scheint aber die Prolin/Serin/Threonin-reiche Region zwischen NHR1 und NHR2 zur Induktion maximaler Repression unbedingt erforderlich zu sein.

3.4 Bestimmung der HMW-Komplexbildung durch Größenausschluß-Chromatographie

In einer Veröffentlichung von Minucci et al. [2000] wurde gezeigt, daß die Bildung hochmolekularer Gewichtskomplexe (HMW-Komplexe) eine entscheidende Rolle in der Entfaltung starker Repression durch AML1-ETO, PML-RAR und PLZF-RAR spielt. Aus diesem Grund wurden einige der hier verwendeten GAL4-ETO-Konstrukte auf ihre Fähigkeit, HMW-Komplexe zu bilden, untersucht. Dazu wurden diese in 293T-Zellen exprimiert und das Molekulargewicht der von ihnen gebildeten Komplexe mittels Größenausschluß-Chromatographie („size-exclusion chromatography“, SEC) bestimmt (Abb. 26).

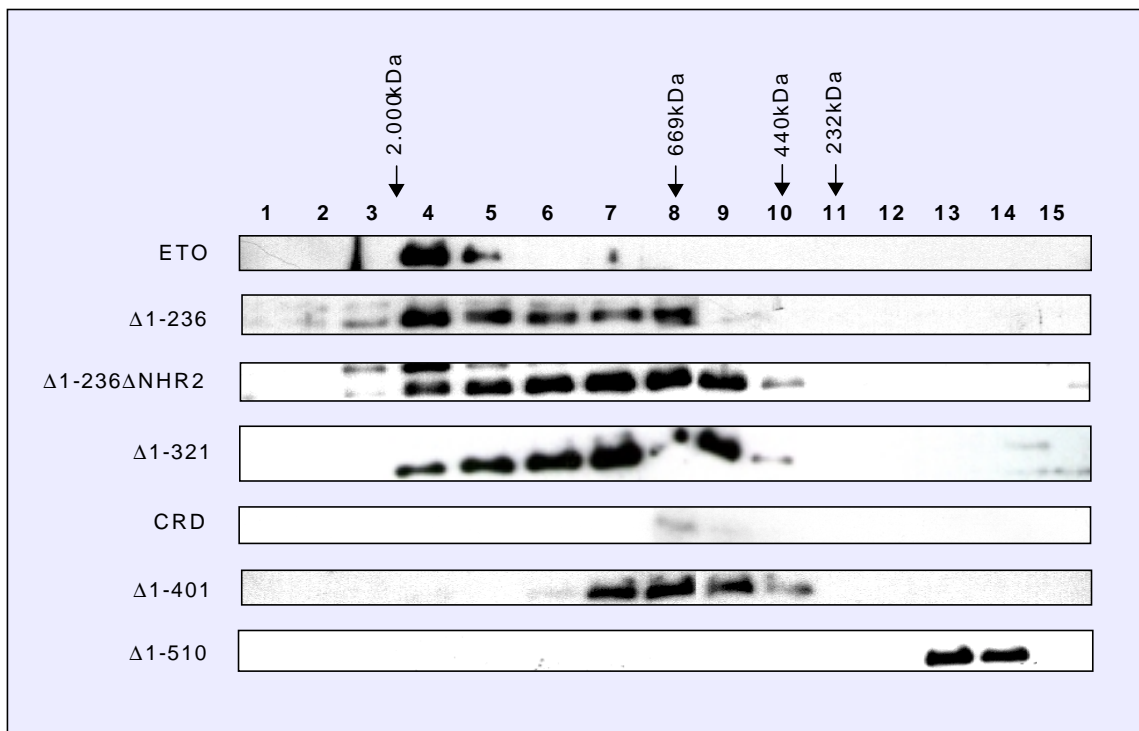


Abb. 26: Western Blot nach Größenausschluß-Chromatographie. Es wurden je 500 µl Zellextrakt von 293T-Zellen, die mit verschiedenen GAL4-ETO-Konstrukten transfiziert wurden, auf eine „Superose 6 HR 10/30“ Größenausschlußsäule geladen. Diese wurde zuvor mit Hilfe von Proteinen bekannten Molekulargewichts geeicht. Die gesammelten 1ml-Fractionen wurden anschließend im Western Blot auf die Anwesenheit von Protein-Komplexen, die GAL4-ETO-Mutanten beinhalten, untersucht. Dazu wurde ein α-ETO- bzw. ein α-GAL4-Antikörper (für das Konstrukt GAL4-CRD) verwendet. Die Fraktionsnummern sowie die Molekulargewichte der Eichproteine und deren Elutionsmaximum sind oben angegeben.

Wie in Abb. 26 zu sehen ist, betrug das Molekulargewicht der von GAL4-ETO gebildeten HMW-Komplexe ca. 1.600 kDa. Auch die Deletionsmutanten GAL4-ETO Δ 1-236, GAL4-ETO Δ 1-236 Δ NHR2 und GAL4-ETO Δ 1-321 bildeten Komplexe dieser Größe. Parallel dazu bildeten diese Proteine aber auch kleinere Komplexe, die in den Fraktionen von 500 bis 1.600 kDa eluiert wurden. Dies könnte auf eine Destabilisierung des HMW-Komplexes hinweisen. Bei Mutanten, die über eine Deletion innerhalb der CRD verfügten, wie z. B. der aminoterminalen Region von NHR2 (GAL4-ETO Δ 1-321), verschob sich das Elutionsmaximum zu einem geringeren Molekulargewicht von ca. 990 kDa. Dies war auch bei dem Konstrukt der Fall, bei dem die NHR2-Domäne vollständig deletiert war (GAL4-ETO Δ 1-236 Δ NHR2). Die Mutante GAL4-ETO Δ 1-401, bei der die CRD komplett fehlte, hatte ihr Elutionsmaximum bei etwa 500 kDa, ähnlich dem Konstrukt, das nur über die CRD allein verfügte (GAL4-CRD). Das Konstrukt GAL4-ETO Δ 1-510 wurde lediglich in seiner dimeren und monomeren Form vorgefunden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Integrität der CRD nicht nur in der durch ETO vermittelten Repression, sondern auch in der Bildung von hochmolekularen Proteinkomplexen eine entscheidende Rolle spielt und daß diese beiden Phänomene miteinander korrelieren.

3.5 Konstruktion von “Aktivator-Proteinen“

Der bisher vorgestellte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der strukturellen und funktionellen Analyse von ETO in Bezug auf dessen Eigenschaften als transkriptioneller Repressor. Es wurden die Regionen charakterisiert, die maßgeblich Repression vermitteln, und es wurde untersucht, welche dieser Regionen mit Corepressoren wie N-CoR und mSin3A interagieren und welche Rolle sie bei der Bildung hochmolekularer Gewichtskomplexe spielen. Aufbauend auf den gewonnenen Daten widmet sich der nachfolgende Teil dieser Arbeit der Konstruktion und Austestung zweier Proteine, die als “Aktivator-Proteine“ die ETO-vermittelte transkriptionelle Repression aufheben sollen. Diese beiden Proteine sind aus zwei unterschiedlichen Domänen aufgebaut: Beide verfügen über die selbe ETO-bindende Domäne, die eine spezifische Interaktion mit ETO gewährleisten soll; die Aufhebung der ETO-vermittelten Repression soll über zwei verschiedene Transaktivierungsdomänen erfolgen.

3.5.1 Auswahl der ETO-bindenden Domäne

Wie in der Literatur beschrieben und in Abb. 25 gezeigt worden ist, ist die NHR2-Domäne für die Homo- und Heterodimerisierung von ETO-Proteinen erforderlich [Kitabayashi et al., 1998]. Der in Abb. 24 vorgestellte “GST pull-down“-Versuch zeigte, daß alle ETO-Deletionsmutanten, die über eine intakte NHR2-Domäne verfügten, in der Lage waren, mit GST-ETO zu dimerisieren. Schon die NHR2-Domäne allein (GAL4-NHR2) war ausreichend, um an GST-ETO zu binden, jedoch konnte diese Interaktion noch verstärkt werden, indem zusätzlich die amino- und carboxyterminalen Regionen hinzugezogen wurden (GAL4-CRD, Abb. 25). Zur Gewährleistung einer optimalen ETO-Dimerisierungsfähigkeit des “Aktivator-Proteins“ wäre demzufolge die CRD als ETO-bindende Domäne besonders gut geeignet. Jedoch zeigten die in Abschnitt 3.2.2 dargestellten Coimmunpräzipitationsexperimente, daß die CRD auch mit dem Corepressor mSin3A interagiert (Abb. 22 und 23). Das würde bedeuten, daß bei Verwendung der CRD als ETO-bindende Domäne mit großer Wahrscheinlichkeit über eine Interaktion mit mSin3A zusätzlich Repression mit in den Komplex gebracht würde, was natürlich nicht erwünscht wäre. Aus diesem Grund ist die CRD als ETO-bindende Domäne nicht geeignet. Die Entfernung der aminoterminal an die NHR2-Domäne angrenzenden Region “N“ im Konstrukt GAL4-NHR2+C resultierte in einer reduzierten mSin3A-Bindungsaktivität in der Coimmunpräzipitation mit *in vitro*

translatierten Proteinen (Abb. 22). In der Coimmunpräzipitation unter Verwendung von Zellextrakten fand mit diesem Konstrukt im Gegensatz zur CRD gar keine Interaktion mit endogenem mSin3A statt (Abb. 23). Ebenso konnte im "GST pull-down"-Versuch keine Interaktion mit N-CoR festgestellt werden (Abb. 21 B, Spur 5). Da also die NHR2+C-Region in der Lage ist, an ETO, aber nicht bzw. nur stark eingeschränkt an N-CoR oder mSin3A zu binden, wurde diese Region als ETO-bindende Domäne für die Konstruktion der "Aktivator-Proteine" ausgewählt und im folgenden als NC-Domäne (für NHR2+C) bezeichnet.

3.5.2 Auswahl der Aktivierungsdomänen

Nachdem für die Vermittlung der spezifischen Bindung an ETO die Wahl auf die NC-Region gefallen war, mußten nun noch geeignete Aktivierungsdomänen ausgewählt werden. Dazu wurde eine Literatur-Recherche durchgeführt. Die Aktivierungsdomäne des "Herpes simplex Virus"-Proteins VP16 ist als starker transkriptioneller Aktivator der frühen viralen Genexpression beschrieben [O'Hare, 1993]. Wenn diese Domäne, die aus den 78 carboxyterminalen Aminosäuren (413 – 490) besteht, an die DNA-bindende Domäne eines heterologen Proteins gekoppelt vorliegt, kann sie die Transkription in unterschiedlichen Systemen effizient aktivieren [Sadowski et al., 1988]. Man vermutet, daß dabei verschiedene Mechanismen zum Einsatz kommen. Zum einen soll die Chromatinstruktur aufgelockert werden [Paranjape et al., 1994], zum anderen sollen Interaktionen mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie stattfinden, die die Bildung des Transkriptions-Initiations-Komplexes am Promotor erleichtern. Dazu gehören Interaktionen mit TBP [Stringer et al., 1990], TFIIB [Lin et al., 1991] und einer Untereinheit des Transkriptionsfaktors H [Xiao et al., 1994]. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde die VP16-Aktivierungsdomäne für die Konstruktion des "Aktivator-Proteins" NC-VP16 ausgewählt. Mit einer Größe von 78 Aminosäuren ist diese Aktivierungsdomäne jedoch für eine mögliche spätere Verwendung als zellgängiges Peptid zu groß. Aus diesem Grund wurde auch noch eine kleinere Aktivierungsdomäne ausgewählt, und zwar das „KIX domain binding peptide 2.20“ (KBP) [Frangioni et al., 2000]. Dieses Peptid gehört zu einer Familie synthetischer Peptide, die beim "Screening" einer Phagenbibliothek, die aus 8 Aminosäuren großen Peptidsequenzen aufgebaut war, gefunden wurde. Dabei wurde die KIX-Domäne der Koaktivator-Proteine p300 und CBP als "target" verwendet. Dieses Peptid ist in der Lage, an p300/CBP zu binden und kann - an eine DNA-Bindungsdomäne gekoppelt – ebenfalls die eukaryotische Genexpression aktivieren [Frangioni et al., 2000].

3.5.3 Klonierung der “Aktivator-Konstrukte“ NC-VP16 und NC-KBP

Die beiden “Aktivator-Konstrukte“ sollten nach ihrer Fertigstellung zunächst im *In-vitro*-Repressionstest auf ihre Fähigkeit, die GAL4-ETO-vermittelte Repression spezifisch aufzuheben, getestet werden. Aus diesem Grund wurden sie in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 kloniert. Die Klonierung erfolgte in mehreren Schritten unter Verwendung chemisch synthetisierter Oligonucleotide, die in Abschnitt 2.1.8 beschrieben wurden. Die einzelnen Schritte sind in den Tabellen 9 (NC-VP16) und 10 (NC-KBP) zusammengefaßt.

| Ausgangskonstrukt | Klonierungsschritt | Zwischen- bzw. Endkonstrukt |
|---------------------------------|---|---------------------------------|
| pcDNA3 | Ligation des Oligonucleotids “Flag-NLS-Spacer“ zwischen <i>HindIII</i> und <i>XhoI</i> in pcDNA3 | pcFlag-NLS-Spacer |
| pcFlag-NLS-Spacer | Ligation des Oligonucleotids „EcoRI-Linker“ zwischen <i>XhoI</i> und <i>XbaI</i> in pcFlag-NLS-Spacer | pcFlag-NLS-Spacer- <i>EcoRI</i> |
| pcFlag-NLS-Spacer- <i>EcoRI</i> | Amplifikation der NC-Domäne mittels PCR; Ligation des restringierten PCR-Produkts zwischen <i>NotI</i> - und <i>XhoI</i> in pcFlag-NLS-Spacer- <i>EcoRI</i> | pcNC |
| pcNC | Ligation der VP16-AD (aus pCMX-VP16) in die <i>EcoRI</i> -Schnittstelle von pcNC | pcNC-VP16 (Endkonstrukt) |

Tab. 9: Klonierungsstrategie zur Herstellung des “Aktivator-Konstruktes“ pc-NC-VP16. (Nähere Erläuterungen im Text sowie im Material- und Methoden-Teil in Abschnitt 2.1.8.)

| Ausgangskonstrukt | Klonierungsschritt | Zwischen- bzw. Endkonstrukt |
|-----------------------|---|--------------------------------|
| pcFlag-NLS-Spacer | Ligation des Oligonucleotids „KBP2.20“ zwischen <i>XhoI</i> und <i>XbaI</i> in pcFlag-NLS-Spacer | pc-Flag-NLS-Spacer-KBP |
| pcFlag-NLS-Spacer-KBP | Amplifikation der NC-Domäne mittels PCR; Ligation des restringierten PCR-Produkts zwischen <i>NotI</i> - und <i>XhoI</i> in pcFlag-NLS-Spacer-KBP | pcNC-KBP (Endkonstrukt) |

Tab. 10: Klonierungsstrategie zur Herstellung des “Aktivator-Konstruktes“ pcNC-KBP. (Nähere Erläuterungen im Text sowie im Material- und Methoden-Teil in Abschnitt 2.1.8.)

Die folgende Abbildung (Abb. 27) zeigt die Plasmidkarten der fertigen Konstrukte. Zur besseren Übersicht ist darunter die Anordnung der inserierten Elemente schematisch in linearisierter Form dargestellt (Abb. 28).

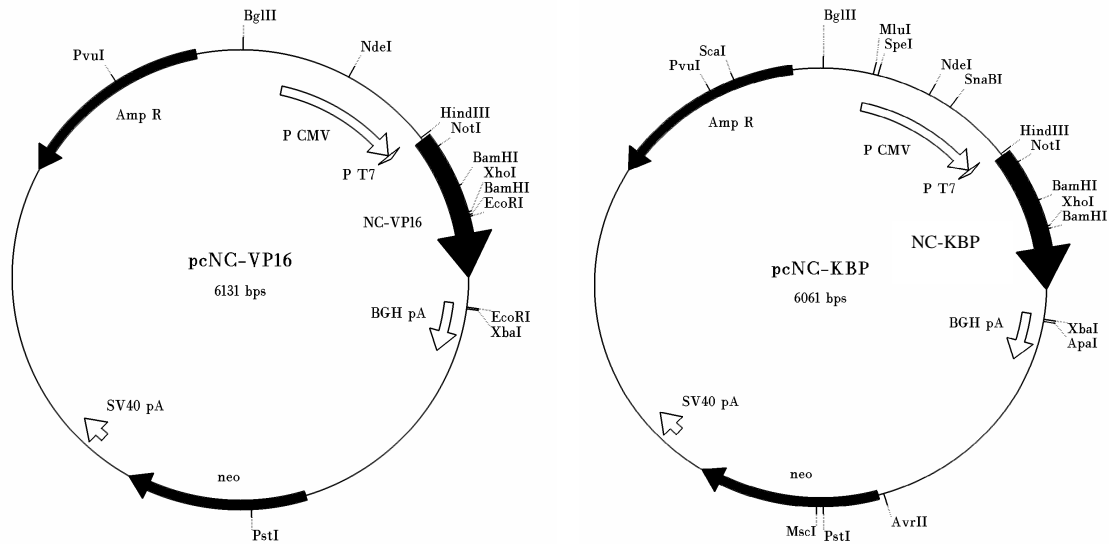


Abb. 27: Plasmidkarten der Konstrukte pcNC-VP16 (links) und pcNC-KBP (rechts). Amp R = Ampicillin-Resistenzgen; P CMV = CMV-Promotor; P T7 = T7-Promotor; BGH pA = BGH ("bovine growth hormone") Polyadenylierungssignal; neo = Neomycin-Resistenzgen; SV40 pA = SV40 Polyadenylierungssignal; bps = Basenpaare.

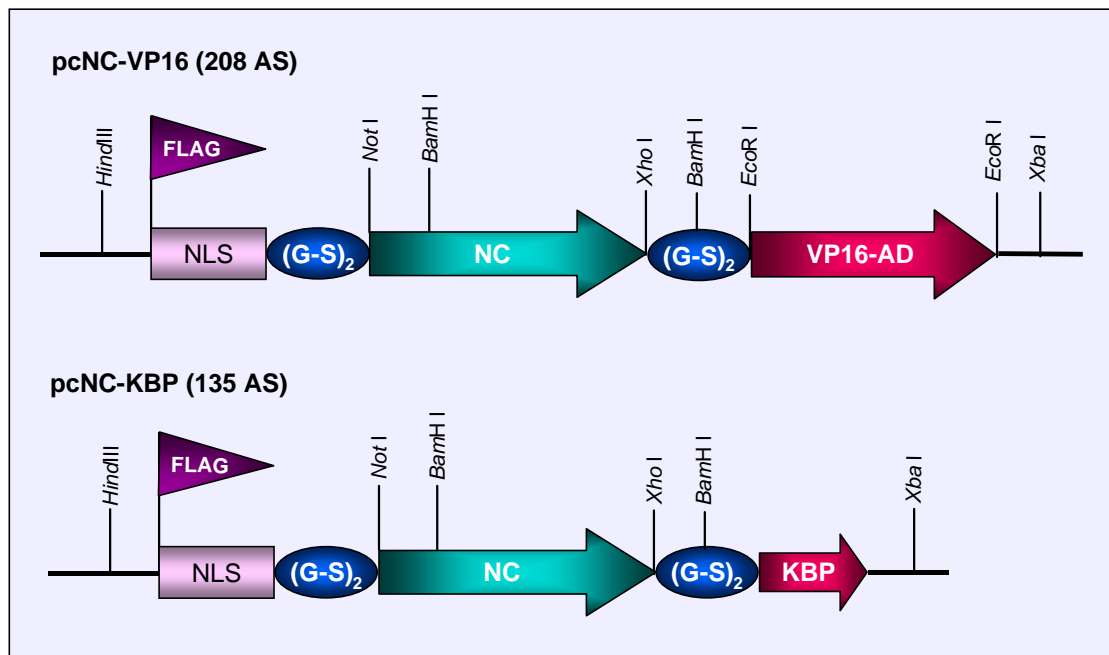


Abb. 28: Schematische Darstellung der in den Vektor pcDNA3 eingefügten Elemente zur Herstellung der "Aktivator-Konstrukte" pcNC-VP16 (oben) und pcNC-KBP (unten). Flag = Flag-Epitop; NLS = "nuclear localisation signal"; (G-S)₂ = Glycin-Serin-Spacer; NC = NC-Domäne; VP16-AD = Aktivierungsdomäne von VP16; KBP = KBP2.20-Peptid (AS-Sequenz WAVYELLF).

Die beiden Konstrukte verfügen neben NC- und Transaktivierungsdomäne zusätzlich noch jeweils über ein Flag-Epitop, eine NLS-Sequenz und zwei Glycin-Serin-Spacer (Abb. 28). Das Flag-Epitop soll eine spätere Detektion der Proteine im Western Blot ermöglichen. Die NLS-Sequenz soll gewährleisten, daß die Proteine auch in den Zellkern transloziert werden, und die Glycin-Serin-Spacer sollen eine freie Faltung der einzelnen Domänen ermöglichen, ohne daß diese sich gegenseitig behindern.

3.6 Untersuchung der “Aktivator-Proteine“ im *In-vitro*-Repressionstest

Um herauszufinden, ob die beiden Konstrukte pcNC-VP16 bzw. pcNC-KBP dazu in der Lage sind, die GAL4-ETO-vermittelte transkriptionelle Repression spezifisch aufzuheben, wurden sie im unter Abschnitt 3.1.1 beschriebenen Testsystem untersucht. Aus vorhergehenden Experimenten war bereits bekannt, daß das Fusionsprotein GAL4-ETO im Vergleich zu GAL4 allein zu einer starken (~ 80fachen) Reduktion der Luziferaseaktivität führte (Abschnitt 3.1.3; Abb. 14). Nun wurden zusätzlich zu dem “Repressor-Plasmid“ GAL4-ETO die Zellen mit den “Aktivator-Plasmiden“ pcNC-VP16 bzw. pcNC-KBP cotransfiziert und dann die Luziferaseaktivität ermittelt (Abb. 29).

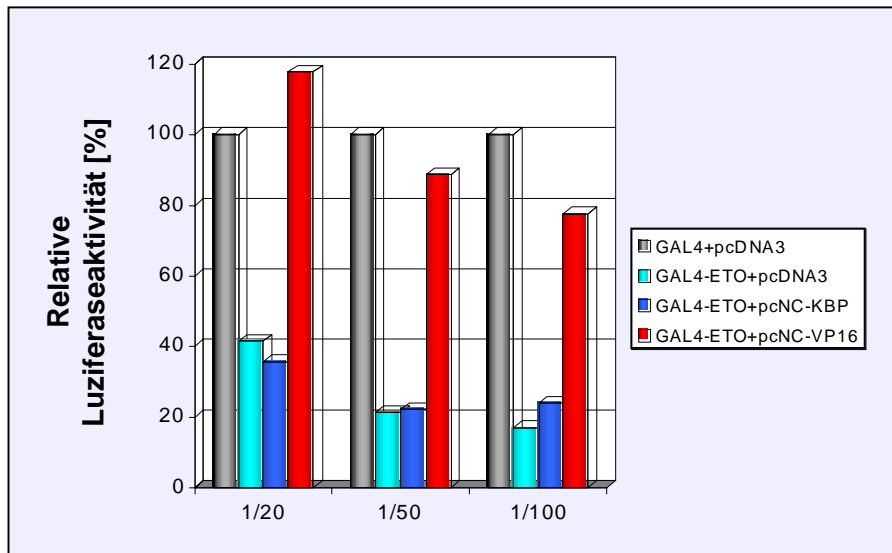


Abb. 29: *In-vitro*-Repressionstest. 293T-Zellen wurden in Duplikaten mit einem Transfektionscocktail bestehend aus 1,5 µg des 2xUAS-TK-luc-Reporterplasmids, 0,75 µg eines promotorlosen Renilla-Luziferaseplasmids (zur Normierung der Transfektionseffizienzen) sowie 200 ng des GAL4- bzw. des GAL4-ETO-Plasmids transfiziert. Zusätzlich wurden die angegebenen Plasmide (pcDNA3, pcNC-KBP bzw. pcNC-VP16) im Verhältnis 1/ 20, 1/50 bzw. 1/100 ("Repressor"-DNA/"Aktivator"-DNA) cotransfiziert. 48 hr nach Transfektion wurde die Luziferaseaktivität gemessen. Angegeben ist jeweils die relative Luziferaseaktivität in %, wobei die relative Luziferaseaktivität von GAL4 allein gleich 100 % gesetzt wurde.

In diesem Experiment wurden zunächst unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse von "Repressor-DNA" zu "Aktivator-DNA" von 1 : 20, 1 : 50 und 1 : 100 getestet (Abb. 29). Bei allen drei Konzentrationsverhältnissen führte die Expression von GAL4-ETO zu einer deutlichen Reduktion der Luziferaseaktivität (von 100 % auf 41,5 % [1 : 20], 21,3 % [1 : 50] bzw. 16,7 % [1 : 100]). Die Coexpression von pcNC-KBP führte bei keiner der gewählten Bedingungen zu einer signifikanten Erhöhung der Luziferaseaktivität, die bei 35,8 % [1 : 20], 22,3 % [1 : 50] bzw. 24 % [1:100] lag. Die Coexpression von pcNC-VP16 resultierte jedoch bei allen drei Konzentrationsverhältnissen in einem eindeutigen Anstieg der Luziferaseaktivität (von 41,5 % auf 117,8 % [1 : 20], von 21,3 % auf 88,7 % [1 : 50] bzw. von 16,7 % auf 77,6 % [1 : 100]). Deshalb wurde dieses Konstrukt in weiteren Experimenten genauer analysiert.

Um zu zeigen, daß NC-VP16 im *In-vitro*-Repressionstest nur die durch GAL4-ETO induzierte transkriptionelle Repression inhibiert und nicht die Repressoraktivität anderer Corepressor-Proteine beeinflusst, wurde der in Abb. 29 dargestellte Versuch um zusätzliche Kontrollen erweitert. So wurde im folgenden Experiment auch überprüft,

ob die Coexpression von NC-VP16 die N-CoR-vermittelte Repression beeinflusst. Außerdem wurde untersucht, ob die einzelnen Domänen von NC-VP16, also die NC- bzw. die VP16-Domäne allein, einen Effekt auf die GAL4-ETO-induzierte Repression ausüben (Abb. 30).

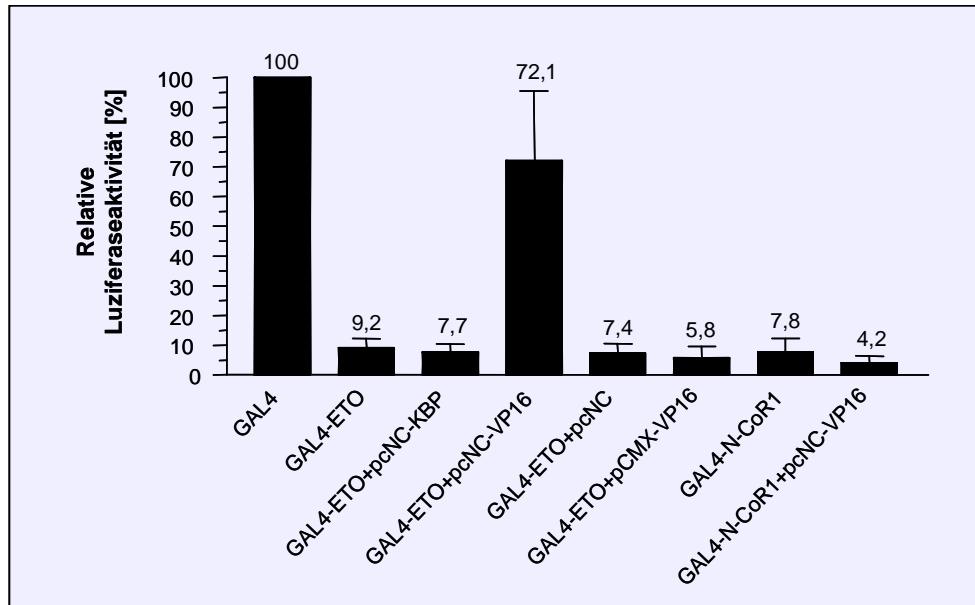


Abb. 30: *In-vitro*-Repressionstest. 293T-Zellen wurden in Duplikaten mit einem Transfektionscocktail bestehend aus 1,5 µg des 2xUAS-TK-luc-Reporterplasmids, 0,75 µg eines promotorlosen Renilla-Luziferaseplasmids (zur Normierung der Transfektionseffizienzen) sowie 0,75 µg des GAL4-Plasmids, des GAL4-ETO-Plasmids oder des GAL4-N-CoR1-Plasmids transfiziert. In vier von fünf Experimenten wurden zusätzlich 0,75 µg der angegebenen "Aktivator"-Plasmide (pcNC-KBP, pcNC-VP16, pcNC bzw. pCMX-VP16) cotransfiziert. In einem Experiment wurde die doppelte Menge an "Aktivator-DNA" (1,5 µg) verwendet. Um überall gleiche DNA-Mengen zu transfizieren, wurde bei den Ansätzen mit GAL4, GAL4-ETO bzw. GAL4-N-CoR1 noch jeweils 0,75 bzw. 1,5 µg pcDNA3-Vektor cotransfiziert. 48 hr nach Transfektion wurde die Luziferaseaktivität gemessen. Angegeben ist jeweils die relative Luziferaseaktivität in %, wobei die relative Luziferaseaktivität von GAL4 allein gleich 100 % gesetzt wurde. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte +/- SEM aus fünf unabhängigen Experimenten.

Die Expression von GAL4-ETO führte zu einer Reduktion der Luziferaseaktivität von 100 % auf 9,2 % (Abb. 30). Die Expression von GAL4-N-CoR1, der Repressor-Domäne 1 (RI) von N-CoR, hatte einen ähnlichen Effekt. Hier verringerte sich die Luziferaseaktivität auf 7,8 %. Während die Coexpression von pcNC-VP16 bewirkte, daß sich die durch GAL4-ETO reduzierte Luziferaseaktivität von 9,2 % auf 72,1 % erhöhte, hatte sie auf die durch GAL4-N-CoR1 verringerte Luziferaseaktivität keinen besonderen Einfluß (7,8 % gegenüber 4,2 %). Dieses Resultat spricht für eine

spezifische Wirkungsweise des NC-VP16-Proteins auf die transkriptionelle Repression, die durch GAL4-ETO verursacht wird. Die Coexpression von GAL4-ETO zusammen mit den einzelnen Domänen von NC-VP16 ergab, daß weder die NC- noch die VP16-Domäne allein eine Erhöhung der Luziferaseaktivität bewirken konnten (9,2 % [GAL4-ETO] gegenüber 7,4 % [GAL4-ETO + pcNC] bzw. 5,8 % [GAL4-ETO + pCMX-VP16]). Das zweite "Aktivator-Konstrukt" pcNC-KBP führte auch in diesem Experiment zu keiner Erhöhung der Luziferaseaktivität (9,2 % [GAL4-ETO] gegenüber 7,7 % [GAL4-ETO + pcNC-KBP]). Da sich die Konstrukte pcNC-KBP und pcNC-VP16 nur in ihren Transaktivierungsdomänen unterscheiden, sprechen diese Ergebnisse dafür, daß das KBP-Peptid im Gegensatz zur VP16-AD nicht für die Aufhebung der ETO-vermittelten Repression geeignet ist.

3.7 Nachweis der ETO-NC-VP16-Interaktion

Um nachzuweisen, daß zwischen GAL4-ETO und NC-VP16 tatsächlich eine Interaktion auf Proteinebene stattfindet, wurde eine Coimmunpräzipitation durchgeführt (Abb. 31).

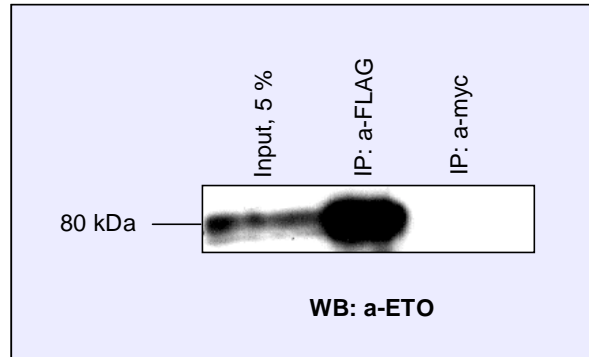


Abb. 31: Coimmunpräzipitation. 293T-Zellen wurden mit GAL4-ETO und pcNC-VP16 cotransfiziert. 48 hr nach Transfektion wurden Zell-Lysate hergestellt und die Proteine mit einem α -Flag-Antikörper bzw. mit einem α -myc-Antikörper (als Negativkontrolle) immunpräzipitiert. Die copräzipitierten GAL4-ETO-Proteine wurden im Western Blot mit einem Antikörper gegen ETO detektiert.

Mit dem gegen das Flag-Epitop von NC-VP16 gerichteten Antikörper ließ sich ca. die 5fache Menge des eingesetzten Input-Materials an GAL4-ETO-Protein copräzipitieren und im nachfolgenden Western Blot mit einem Antikörper gegen ETO detektieren (Abb. 31). Das bedeutet, daß die beiden Proteine NC-VP16 und GAL4-ETO miteinander

interagieren. Im Gegensatz dazu führte die Immunpräzipitation mit einem α -myc-Antikörper als Negativkontrolle zu keiner Copräzipitation von GAL4-ETO-Protein.

3.8 Transduktion hämatopoetischer Zellen mit NC-VP16

3.8.1 Herstellung des retroviralen Vektors PINCO-NC-VP16

Um herauszufinden, ob das "Aktivator-Konstrukt" NC-VP16 auch in Zelllinien spezifische Effekte zeigt, wurde es in den retroviralen Vektor "PINCO" [Grignani et al., 1998] (Abb. 10) kloniert und anschließend zur Transduktion hämatopoetischer Zellen eingesetzt. Für die Klonierung wurde zunächst ein chemisch synthetisiertes Linker-Fragment (XP-Linker, Abschnitt 2.1.8), das eine *Xho*- und *Pme*I-Schnittstelle beinhaltet, zwischen die *Bam*HI- und *Eco*RI-Schnittstellen von PINCO eingefügt. Die für NC-VP16 codierende Sequenz wurde über PCR amplifiziert (Abschnitt 2.2.3) und in den modifizierten PINCO-Vektor (PINCO-XP) zwischen die *Xho*- und *Pme*I-Schnittstellen kloniert. Die folgende Abbildung (Abb. 32) zeigt die Plasmidkarte des fertigen Konstrukts PINCO-NC-VP16:

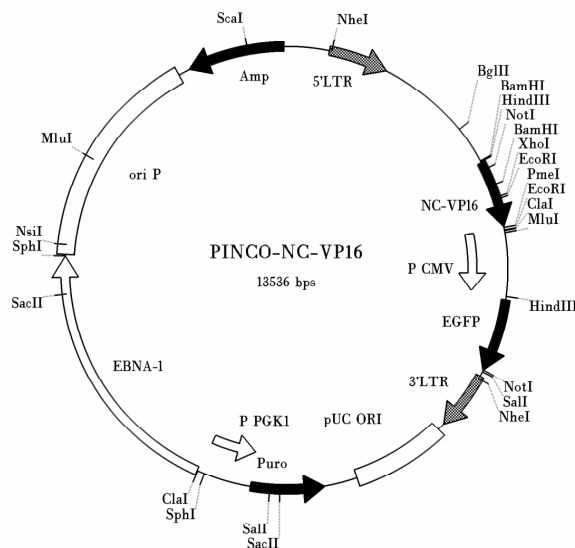


Abb. 32: Plasmidkarte des retroviralen Konstrukts PINCO-NC-VP16. 5'- und 3'-LTR (long terminal repeats) stammen aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus. P CMV = CMV-Promotor; EGFP = "enhanced green fluorescence protein"; pUC ORI = pUC "origin of replication"; Puro = Puromycin-Resistenzgen; P PGK1 = PGK-1-Promotor; EBNA-1 = EBNA-1-Gen (Epstein-Barr-Kernantigen) aus dem EBV- (Epstein-Barr-Virus-) Genom; ori P = ori P Replicon aus dem EBV-Genom; Amp = Ampicillin-Resistenzgen; bps = Basenpaare.

3.8.2 Transduktionsexperimente

Die hämatopoetische Zell-Linie Kasumi-1 trägt die Translokation t(8;21) und verfügt somit über endogenes AML1-ETO-Protein. Sie eignet sich deshalb gut dazu, um zu analysieren, ob die Expression von NC-VP16 auch *"in vivo"* zu spezifischen Effekten führt wie z. B. zur Überwindung der AML1-ETO-vermittelten Differenzierungsblockade. Aus diesem Grund wurden Kasumi-1-Zellen mit PINCO-NC-VP16 transduziert, mit dem Ziel, mögliche Auswirkungen von NC-VP16 auf das Differenzierungsverhalten dieser Zellen feststellen zu können. Um einen Vergleich mit einer anderen Zelllinie, die nicht über endogenes AML1-ETO-Protein verfügt, zu ermöglichen und damit die Spezifität möglicher Effekte beurteilen zu können, wurden zusätzlich noch Jurkat-Zellen mit PINCO-NC-VP16 transduziert.

Zur Herstellung retroviraler Viruspartikel wurden 293T-Zellen transient in einer "Drei-Plasmide-Transfektion" (Abschnitt 2.3.4) cotransfiziert. Die Infektiösität des Virusüberstandes wurde in einer Titerbestimmung auf 293T-Zellen (Abschnitt 2.3.6.) mittels FACS-Analyse ermittelt (Abb. 33):

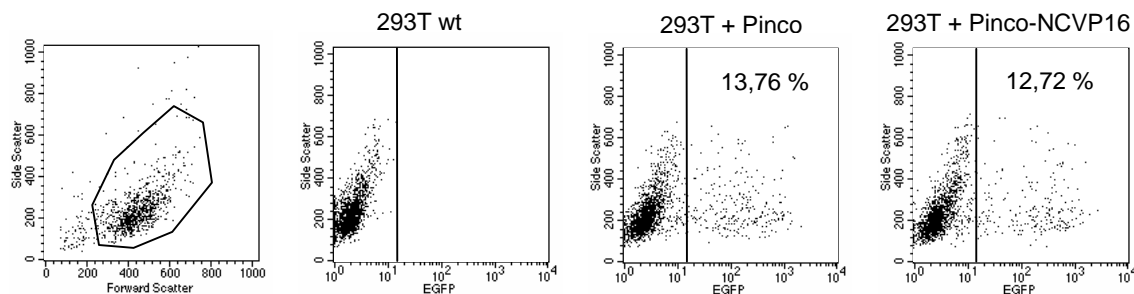


Abb. 33: Titerbestimmung der Virusüberstände PINCO und PINCO-NC-VP16 mittels FACS-Analyse anhand der EGFP-Expression. Der geerntete Virusüberstand wurde seriell in Zehnerschritten verdünnt und zur Transduktion von 293T-Zellen eingesetzt. 72 hr nach Transduktion wurde die EGFP-Expression im FACS gemessen. Die Abbildung zeigt die FACS-Ergebnisse der Transduktionen mit den 1 : 10-verdünnten Virusüberständen, die zur Berechnung des Titers herangezogen wurden.

Von den mit dem PINCO-Virusüberstand transduzierten Zellen exprimierten 13,76 % 72 hr nach Transduktion EGFP, von den mit dem PINCO-NC-VP16 transduzierten Zellen 12,72 % (Abb. 33). Bei einer Zellzahl von 340.000 293T-Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion ergab sich daher für den PINCO-Virusüberstand ein Titer von $4,7 \cdot 10^5$ TU/ml, für den PINCO-NC-VP16-Virusüberstand ein Titer von $4,3 \cdot 10^5$ TU/ml.

Die beiden Virusüberstände waren also in Bezug auf ihre Infektiosität miteinander vergleichbar.

Mit diesen Virusüberständen wurden Kasumi-1- und Jurkat-Zellen an drei aufeinanderfolgenden Tagen nach dem in Abschnitt 2.3.5 beschriebenen Protokoll transduziert. Vier, sechs und acht Tage nach dem letzten Transduktionszyklus wurde die EGFP-Expression mittels FACS-Analyse ermittelt. Die folgende Abbildung (Abb. 34) zeigt die Ergebnisse der FACS-Messung der transduzierten Kasumi-1-Zellen.

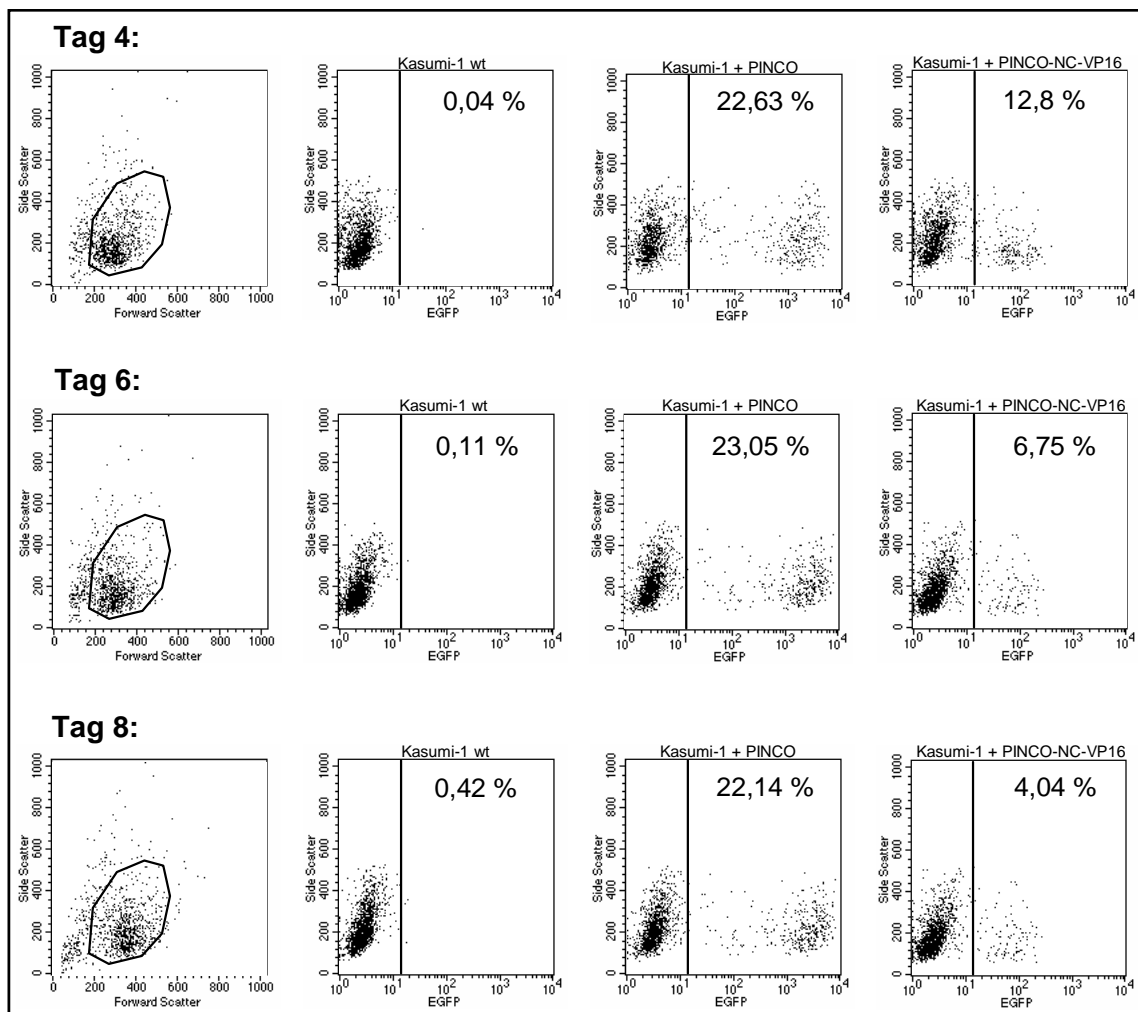


Abb. 34: FACS-Analyse der transduzierten Kasumi-1-Zellen vier (oben), sechs (Mitte) und acht Tage (unten) nach dem letzten Transduktionszyklus. Angegeben ist jeweils der Anteil EGFP-exprimierender Zellen in %.

Bei den mit PINCO-Virusüberstand transduzierten Zellen betrug der Anteil EGFP-exprimierender Zellen vier Tage nach der letzten Transduktion 22,63 %. Dieser Wert veränderte sich auch über den acht Tage andauernden Versuchszeitraum nicht deutlich (23,05 % an Tag 6 und 22,14 % an Tag 8), so daß man von einer konstanten EGFP-Expression über den Versuchszeitraum sprechen kann. Anders verhielt es sich hingegen mit den Zellen, die mit dem PINCO-NC-VP16-Virusüberstand transduziert wurden. Obwohl die Virusüberstände PINCO und PINCO-NC-VP16 in ihrer Infektiösität vergleichbar waren, konnten mit dem PINCO-NC-VP16-Virus nur 12,8 % der Zellen transduziert werden. Besonders auffallend war aber, daß die EGFP-Expression, die ja als Marker für NC-VP16-exprimierende Zellen dient, über den Versuchszeitraum sehr stark abfiel. So betrug der Anteil EGFP-exprimierender Zellen an Tag 6 nur noch 6,75 %, an Tag 8 sogar nur noch 4,04 %. Setzt man den Anteil EGFP-exprimierender Zellen an Tag 4 gleich 100 %, so entspricht dies einer Abnahme von 68,4 % auf 31,6 % an Tag 8. Da die EGFP-Expression ja als Marker für diejenigen Zellen dient, die nach erfolgreicher Transduktion das NC-VP16-Gen enthalten sollten, stellte sich hier die Frage, warum es zu einer solchen starken Abnahme der EGFP-Expression kam. Deshalb wurden zum Vergleich Jurkat-Zellen mit den selben PINCO- bzw. PINCO-NC-VP16-Virusüberständen transduziert (Abb. 35).

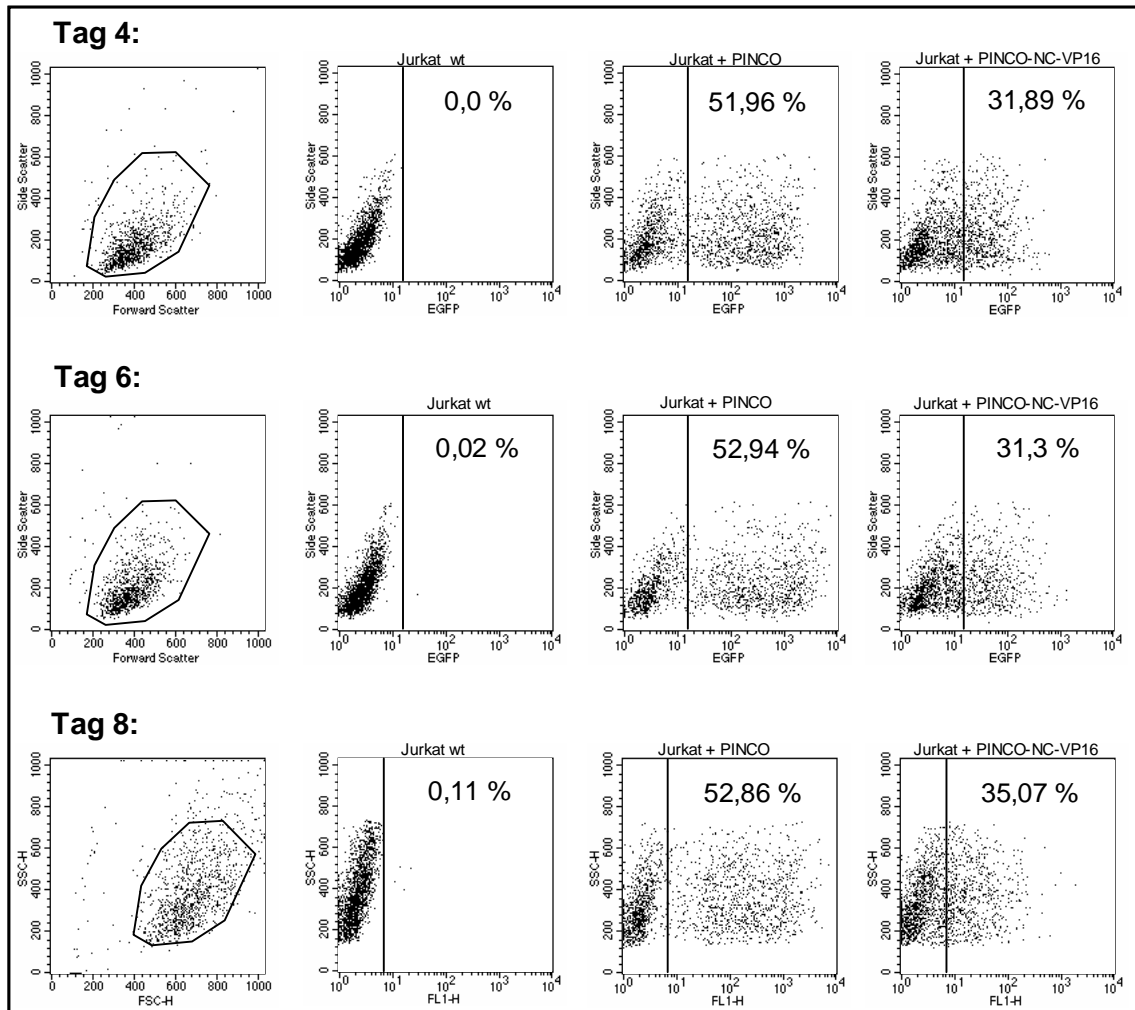


Abb. 35: FACS-Analyse der transduzierten Jurkat-Zellen vier (oben), sechs (Mitte) und acht (unten) Tage nach dem letzten Transduktionszyklus. Angegeben ist jeweils der Anteil EGFP-exprimierender Zellen in %.

Die Jurkat-Zellen ließen sich deutlich leichter transduzieren als die Kasumi-1-Zellen, was mit den Proliferationseigenschaften der beiden Zelllinien zusammenhängt. Jurkat-Zellen proliferieren deutlich schneller als Kasumi-1-Zellen und lassen sich dementsprechend effizienter mit Retroviren transduzieren, die auf die Infektion proliferierender Zellen beschränkt sind. So betrug der Anteil EGFP-exprimierender Jurkat-Zellen, die mit dem PINCO-Virusüberstand transduziert wurden, an Tag vier 51,96 %. Dieser Anteil blieb über den Versuchszeitraum hin konstant (52,94 % an Tag 6 und 52,86 % an Tag 8). Mit dem PINCO-NC-VP16-Virusüberstand konnten 31,89 % der Zellen (Tag 4) transduziert werden. Während bei den Kasumi-1-Zellen eine deutliche Abnahme der EGFP-Expression von Tag 4 auf Tag 8 festzustellen war, blieb bei den Jurkat-Zellen die EGFP-Expression und damit der Anteil der Zellen, die das NC-VP16-Gen enthalten sollten, über den Versuchszeitraum konstant (31,3 % an Tag 6 und 35,07 % an Tag 8). Um die hier gewonnenen Daten zu verifizieren, wurde eine

zweite Transduktion beider Zelllinien durchgeführt, die die oben gezeigten Ergebnisse bestätigte. In der folgenden Abbildung (Abb. 36) sind die Ergebnisse aus den beiden unabhängigen Transduktionsexperimenten zusammengefaßt:

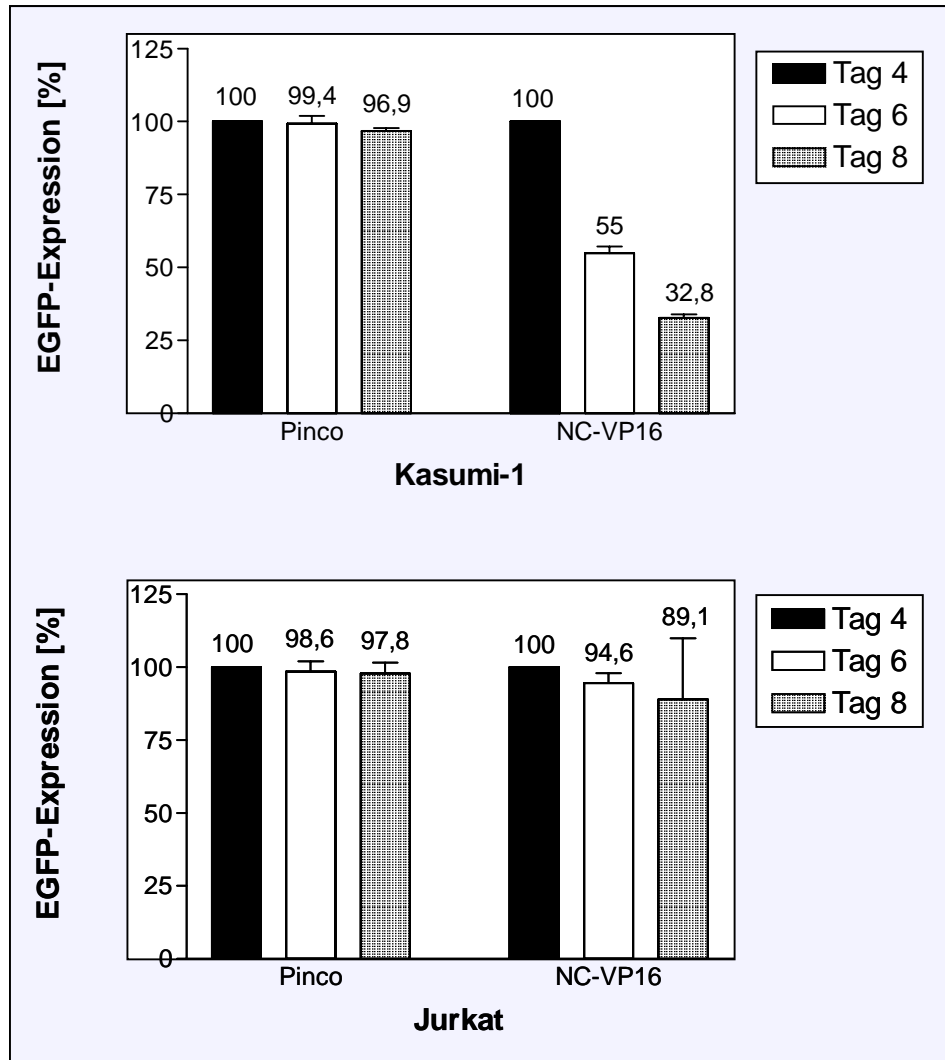


Abb. 36: Zusammenfassung der FACS-Analysen aus jeweils zwei unabhängigen Transduktionsexperimenten. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM, wobei die Mittelwerte über den jeweiligen Balken angegeben sind. Der Anteil EGFP-exprimierender Zellen an Tag 4 wurde gleich 100 % gesetzt.

Sowohl bei den mit dem PINCO-Virusüberstand transduzierten Kasumi-1- als auch den Jurkat-Zellen war während des acht Tage andauernden Versuchzeitraums keine deutliche Abnahme der EGFP-Expression festzustellen. So betrug der Anteil EGFP-exprimierender Zellen nach acht Tagen 96,9 % (Kasumi-1) bzw. 97,8 % (Jurkat). Bei den mit dem PINCO-NC-VP16-Virusüberstand transduzierten Zellen machte sich jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen den Kasumi-1 und Jurkat-Zellen im Hinblick auf die EGFP-Expression bemerkbar. Während bei den Jurkat-Zellen nur eine

minimale Abnahme auf 89,1 % festzustellen war, reduzierte sich bei den Kasumi-1-Zellen der Anteil EGFP-exprimierender Zellen auf 32,8 % an Tag 8.

Die oben beschriebenen Transduktionsexperimente sollten eigentlich dazu dienen, das Differenzierungsverhalten der mit PINCO-NC-VP16 transduzierten Kasumi-1-Zellen zu untersuchen und mit dem der mit PINCO transduzierten Zellen zu vergleichen. Jedoch konnte trotz optimierten Transduktionsprotokolls nur ein kleiner Anteil der Kasumi-1-Zellen erfolgreich mit dem retroviralen Konstrukt PINCO-NC-VP16 transduziert werden. Hinzu kam, daß der Anteil der EGFP-exprimierenden und damit das NC-VP16-Gen enthaltenden Zellen innerhalb von vier Tagen so stark abnahm, daß ein Differenzierungstest aufgrund zu geringer Zellzahlen nicht durchführbar war. Die Frage, ob NC-VP16 auch *"in vivo"* einen spezifischen Effekt auf AML1-ETO ausüben kann und zur (teilweisen) Überwindung der AML1-ETO-vermittelten Differenzierungsblockade führt, konnte aus diesen Gründen noch nicht geklärt werden. Die Tatsache, daß sich der Anteil der Kasumi-1-Zellen, die das NC-VP16-Gen enthielten, im Gegensatz zu den Jurkat-Zellen nach nur vier Tagen so stark dezimiert hatte, könnte allerdings darauf hindeuten, daß es sich hier um einen spezifischen Effekt des NC-VP16-Proteins auf AML1-ETO exprimierende Zellen handelt. Um diese Frage jedoch eindeutig klären zu können, müßten in Zukunft noch weitere Experimente durchgeführt werden.

4 Diskussion

Die akute myeloische Leukämie ist eine heterogene Krankheit, die durch eine große Zahl an genetischen Defekten charakterisiert ist. Dazu gehören Modifikationen in Signaltransduktionswegen und Veränderungen von Wachstumsfaktor-Rezeptoren sowie Translokationen, die Onkogene und Transkriptionsfaktoren betreffen. Der Transkriptionsfaktor AML1 ist eines der am häufigsten mutierten Gene bei Leukämiepatienten und in verschiedenen Translokationen involviert. Die zahlreichste dieser Translokationen, die t(8;21), ist bei ca. 40 % der Patienten mit AML-M₂ zu finden. Dabei kommt es zur Fusion der DNA-Bindungsdomäne von AML1 mit ETO. Das daraus resultierende Fusionsprotein AML1-ETO ist aufgrund seiner Interaktionen mit den transkriptionellen Corepressor-Proteinen N-CoR und mSin3A maßgeblich an dem in den leukämischen Blasten vorliegenden Differenzierungsblock verantwortlich und trägt so zu einem großen Teil zur Leukämieentstehung bei. Um mögliche Ansatzpunkte für eine molekulare Therapieform zu finden, die eine Inhibierung der störenden Auswirkungen des Translokationsproduktes AML1-ETO auf das Differenzierungsverhalten myeloischer Vorläuferzellen beabsichtigt, ist es notwendig, zunächst möglichst umfassende Kenntnisse über die Eigenschaften dieses Fusionsproteins zu gewinnen. Dies war die Absicht der vorliegenden Arbeit. Dabei wurden die folgenden Fragestellungen bearbeitet:

- Welche Domänen in ETO vermitteln transkriptionelle Repression?
- Welche Regionen sind für die Interaktionen mit den Corepressoren N-CoR und mSin3A erforderlich?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen der Vermittlung transkriptioneller Repression und der Bildung hochmolekularer Gewichtskomplexe?
- Wie könnte ein Protein aufgebaut sein, das dazu in der Lage ist, die ETO-vermittelte transkriptionelle Repression zu inhibieren?

4.1 Struktur und Funktion einer minimalen Repressor-Domäne in ETO

4.1.1 Eine "Core repressor Domäne" (CRD) vermittelt unabhängig von N-CoR transkriptionelle Repression

Um diejenigen Regionen in ETO zu identifizieren, die transkriptionelle Repression vermitteln, wurde eine Serie von GAL4-ETO-Deletionsmutanten konstruiert, die auf ihre Fähigkeit, die Transkription von einem Luziferase-Reporterkonstrukt aus zu reprimieren, getestet worden sind (Kapitel 3.1). Dabei zeigte sich, daß in diesem Testsystem der Aminoterminus von ETO (AS 1-236) einschließlich NHR1 zur Erzielung maximaler Repression nicht erforderlich ist. Dies stimmt mit den von Lutterbach et al. [1998a] publizierten Daten überein, die zeigten, daß die Deletion der NHR1 die ETO-vermittelte Repression des MDR-1 Promotors ("multidrug resistance 1 promoter") nicht beeinflusste. Die NHR1 verfügt über Homologien zu einem 80 Aminosäuren umfassenden Bereich, der in den Transkriptionscoaktivatoren hTAF (humaner TBP-assoziiertes Factor) 130, hTAF 105 und *Drosophila* TAF 110 zu finden ist [Hoey et al., 1993; Erickson et al., 1994; Dikstein et al., 1996; Kitabayashi et al., 1998]. Der amphipatischen Helix NHR2 wurde bereits eine wichtige Aufgabe für die Bildung von ETO-Homo- und -Heterodimeren zugeschrieben [Lutterbach et al., 1998a; Kitabayashi et al., 1998a]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die NHR2 auch für die reprimierenden Eigenschaften von ETO von Bedeutung ist. So führte die Deletion der NHR2 (im Konstrukt GAL4-ETO Δ 1-236 Δ NHR2) zu einer Abnahme der Repression auf nur 22,3 % der wtETO-Repressoraktivität. Einen ähnlichen Wert, nämlich 22,4 % erzielte ein Konstrukt, bei dem die NHR2 vorhanden, der an sie angrenzende aminoterminaler Bereich jedoch deletiert war (GAL4-ETO Δ 1-321). Dieses Resultat läßt der Region, die zwischen NHR1 und NHR2 liegt (AS 237-321), eine neue, bisher unbeachtete Rolle in der Vermittlung transkriptioneller Repression zukommen. Eine Erklärung hierzu sollte sich in nachfolgenden Experimenten finden, die ergaben, daß ein Teil dieser Region für die Interaktion mit einem anderen Corepressor, mSin3A, benötigt wird. Bei einem Konstrukt, bei dem zusätzlich zum Aminoterminus (der ja auf die Repression keinen Einfluß hat) auch der Carboxyterminus von ETO entfernt worden war (GAL4-CRD), verringerte sich die transkriptionelle Repression auf 40,4 % der wtETO-Repression. Dennoch stellt dieses Konstrukt, das lediglich die "Core Repressor Domain" (CRD) umfaßt (AS 237 – 432), die kleinste GAL4-ETO-

Deletionsmutante dar, die allein noch über deutliche Repressoraktivität verfügt. Deletionen innerhalb der CRD wie z. B. der angrenzende carboxyterminale Bereich (Δ AS 389 – 431 im Konstrukt GAL4-ETO Δ 1-236 Δ C) bewirkten ebenfalls eine starke Abnahme der Repression auf 49,3 % (im Vergleich zu 102,6 % Repression, die das Vergleichskonstrukt GAL4-ETO Δ 1-236 erzielte). Diese Ergebnisse dokumentieren, wie wichtig eine intakte CRD für die Entfaltung maximaler Repression ist und zeigen auch, daß die Repressoraktivität dieser Region unabhängig von einer N-CoR-Interaktion ist.

4.1.2 Die durch ETO vermittelte Repression hängt nur teilweise von der Anwesenheit der NHR2-Domäne ab

Kitabayashi et al. [1998a] haben gezeigt, daß es sich bei der NHR2-Domäne um eine amphipathische Helix handelt, die für die Homo- und Heterodimerisierung zwischen ETO und anderen Mitgliedern der ETO-Familie erforderlich ist. Um nachzuweisen, daß die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte, die die NHR2-Domäne beinhalten, auch tatsächlich über eine intakte Helix-Struktur verfügten, wurde ein "GST pull-down"-Experiment durchgeführt, in dem alle NHR2-Konstrukte mit einem GST-ETO-Fusionsprotein präzipitiert werden konnten. Daß die NHR2-Domäne auch Einfluß auf die Repressoraktivität des ETO-Proteins hat, stellte sich bei einem Konstrukt heraus, bei dem die NHR2-Domäne deletiert worden war (GAL4-ETO Δ 1-236 Δ NHR2). Dieses Konstrukt verfügte nur über eine stark reduzierte Repressoraktivität (22,3 % im Vergleich zu 102,6 % des entsprechenden Konstruktes ohne NHR2-Deletion). Die ETO vermittelte Repression hängt allerdings nur zum Teil von der intakten Helixstruktur ab, was durch ein Konstrukt gezeigt werden konnte, das über eine vollständige NHR2-Domäne verfügte (GAL4-ETO Δ 1-321) und trotz unverminderter Fähigkeit zur Homodimerisierung nur eine relativ geringe Repression (22,4 %) erzielte.

4.1.3 Die CRD vermittelt die Bindung an mSin3A

Wie bereits in Kapitel 4.1.1 beschrieben wurde, fiel in den *In-vitro*-Repressionstests eine Region auf, die aufgrund ihrer zentralen Lage im ETO-Molekül und ihrer offensichtlichen Repressoraktivität mit "Core Repressor Domain" (CRD) bezeichnet wurde. Um herauszufinden, ob die transkriptionsreprimierende Eigenschaft dieser Domäne auf einer Interaktion mit einem Corepressor beruht, wurden Coimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt (Kapitel 3.2.2). Die Tatsache, daß

bereits eine Interaktion zwischen endogenem ETO und mSin3A in HEL-Zellen nachgewiesen werden konnte [Lutterbach et al., 1998b], und die Beobachtung, daß N-CoR an den Carboxyterminus von ETO bindet, ließ vermuten, daß möglicherweise mSin3A mit der CRD interagiert. Sowohl mit *in vitro* translatierten Proteinen als auch Proteinen, die aus transfizierten humanen Zellen gewonnen worden waren, konnte eine starke Interaktion zwischen der CRD und mSin3A nachgewiesen werden. Damit wurde zum ersten Mal die mSin3A-Bindungsstelle in ETO definiert. Entsprechend zeigten GAL4-ETO-Proteine, bei denen Teile der CRD deletiert worden waren, *in vitro* keine (GAL4-ETO Δ 1-236 Δ NHR2 und GAL4-ETO Δ 1-236 Δ C) oder nur eine stark reduzierte (GAL4-N+NHR2 und GAL4-NHR2+C) Interaktion mit mSin3A. In Zell-Lysaten konnte bei GAL4-ETO-Mutanten, denen die NHR2 oder die angrenzende aminoterminal Region fehlte, noch eine schwache Bindung an mSin3A festgestellt werden. In einer kürzlich veröffentlichten Studie, die sich ebenfalls mit der ETO-mSin3A-Interaktion auseinandersetzte, wurde die mSin3A-Bindungsstelle noch weiter auf die AS 300 – 385 in ETO eingegrenzt [Amann et al., 2001]. Diese Region liegt innerhalb der CRD (AS 237 – 432) und überlappt mit den hier verwendeten Konstrukten GAL4-N+NHR2 (AS 237 – 388) und GAL4-NHR2+C (AS 321 – 432). Darüber hinaus wird in der von Amann et al. publizierten Arbeit postuliert, daß ETO über eine zweite mSin3A-Bindungsstelle verfügt, die sich in der Region zwischen AS 379 bis 499 befinden soll. Sollte diese Behauptung tatsächlich zutreffen, so könnte das erklären, weshalb ein GAL4-ETO-Protein, bei dem die NHR2-Domäne deletiert worden war (GAL4-ETO Δ 1-236 Δ NHR2), noch schwach an mSin3A binden konnte. Dabei ist aber zu beachten, daß dieses Konstrukt nur etwa die Hälfte der Repression der CRD erzielt (22,3 % gegenüber 40,4 %), obwohl es auch den kompletten Carboxyterminus beinhaltet.

Die Fähigkeit der CRD zur Induktion transkriptioneller Repression läßt sich also durch ihre starke Interaktion mit mSin3A begründen. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch, daß die CRD (AS 237 – 387) zu einem großen Teil mit der Bindungsstelle eines anderen Corepressors, PLZF, überlappt. Diese Interaktion wurde auf die AS 217 – 345 umfassende Region in ETO kartiert [Melnick et al., 2000] und trägt wahrscheinlich auch zur Repressoraktivität der CRD bei.

Um herauszufinden, wo sich die ETO-Bindungsstelle in mSin3A befindet, wurden "GST pull-down"-Experimente durchgeführt, mit deren Hilfe die ETO-Bindungsstelle in die Region der PAH2 ("paired amphipathic helix" 2) kartiert wurde. Für diese Region ist bereits eine Interaktion mit der Repressor-Domäne eines anderen Corepressors,

Mad I, gezeigt worden [Schreiber-Agus et al., 1995]. Eine Interaktion zwischen der CRD und mSin3B konnte dagegen nicht nachgewiesen werden.

4.2 Optimale ETO-Funktion wird durch die Kooperation mehrerer Regionen erzielt

4.2.1 Maximale transkriptionelle Repression entsteht durch das Zusammenspiel mehrerer Domänen

Die Daten aus den *In-vitro*-Repressionstests haben verdeutlicht, daß schon die Deletion einzelner Domänen zu einer starken Verminderung der ETO-vermittelten Repression führen kann. Dies trifft - wie in Kapitel 4.1.1. beschrieben - vor allem auf Regionen innerhalb der CRD zu. Aber auch der Carboxyterminus von ETO mit den Regionen NHR3 und NHR4 trägt zur Repressoraktivität des Proteins bei. Wie bereits in der Literatur beschrieben wurde, sind die beiden Zinkfinger motive in der NHR4 für eine Interaktion zwischen ETO und N-CoR erforderlich [Gelmetti et al., 1998; Wang et al., 1998]. Sogar die Veränderung einzelner konservierter Aminosäuren in einem der beiden Zinkfinger motive führte zu einem Verlust der ETO-N-CoR-Interaktion [Lutterbach et al., 1998]. In dieser Arbeit konnte einerseits gezeigt werden, das ein GAL4-Konstrukt, das den kompletten C-terminus von ETO (AS 401 – 604) einschließlich der Regionen NHR3 und NHR4 beinhaltet, zwar nur über eine minimale Repressoraktivität von 5,4 % verfügte. Doch führte andererseits die Deletion der Regionen NHR3 und NHR4 (im Konstrukt GAL4-CRD) auch zu einer deutlichen Abnahme der Repression auf 40,4 %. Die Regionen NHR3 und NHR4 werden demzufolge benötigt, um maximale Repression zu erzielen, sind jedoch allein nicht ausreichend, die Transkription eines Reportergenes effizient zu reprimieren. Zur Induktion maximaler Repression benötigt ETO folglich alle Regionen mit Ausnahme der N-terminalen 236 Aminosäuren.

4.2.2 Die ETO-N-CoR-Interaktion erfordert auch die Anwesenheit der NHR3-Domäne

Um die Struktur-Funktionsbeziehung der C-terminalen NHR3+4-Region näher zu untersuchen, wurden entsprechende GST-ETO-Fusionskonstrukte entworfen, die in "GST pull-down"-Versuchen auf ihre Interaktion mit N-CoR getestet wurden (Kapitel 3.2.1). Dabei stellte sich heraus, daß ein GST-ETO-Fusionsprotein, das über die Regionen NHR3 und NHR4 verfügte (GST-NHR3+4), im Gegensatz zu einem Fusionsprotein aus GST und der NHR4 allein (GST-NHR4) in der Lage war, an N-CoR zu binden. Da das entsprechende GAL4-Konstrukt (GAL4-ETO Δ 1-401) aber über keine deutliche Repressoraktivität verfügte (nur 5,4 %), läßt sich daraus schließen, daß eine Interaktion mit N-CoR per se nicht ausreicht, um bedeutende transkriptionelle Repression zu vermitteln. Die Tatsache, daß in diesem Experiment die NHR4 allein nicht in der Lage war, mit N-CoR zu interagieren, steht im Widerspruch zu den Daten von Lutterbach et al. [1998b], die in einem "Yeast two-hybrid assay" eine Interaktion zwischen N-CoR und einem GAL4-NHR4-Protein nachgewiesen haben. Möglicherweise beruht diese Unstimmigkeit auf der Verwendung unterschiedlicher Testsysteme. Während in dieser Arbeit die Interaktionen in einem "zellfreien" System mit Hilfe von bakteriell exprimierten Proteinen und *in vitro* translatierten Proteinen untersucht wurden, verwendeten Lutterbach et al. ein System, bei dem die Proteine in Hefezellen exprimiert wurden.

Darüber hinaus wurde die mit ETO interagierende Domäne in N-CoR weiter eingegrenzt: Die minimale ETO-Bindungsstelle in N-CoR wurde in die Region zwischen AS 1147 und 1213 kartiert und liegt somit in der Repressor-Domäne III. Dies läßt sich aus Versuchen ableiten, die zeigten, daß ein GAL4-N-CoR-Protein, das die AS 970 – 1258 umfaßte, nicht aber ein kleineres Protein (GAL4-N-CoR 970 – 1147) oder eine weiter carboxyterminal lokalisierte Region (GAL4-N-CoR 1213 – 1502) mit GST-NHR3+4 präzipitiert werden konnte. Dadurch wurde die von Wang et al. [1998] für die Interaktion mit ETO angegebene Region (N-CoR 988 – 1816) weiter eingegrenzt.

4.2.3 Die Bildung hochmolekularer Gewichtskomplexe erfordert eine intakte ETO-Struktur

Die Bildung hochmolekularer Gewichtskomplexe (HMW-Komplexe) spielt im Zusammenhang mit transkriptioneller Repression durch Corepressor-Proteine eine

entscheidende Rolle [Lutterbach et al., 1998b]. Dies konnte auch schon für die Translokationsprodukte AML1-ETO, PML-RAR und PLZF-RAR nachgewiesen werden [Minucci et al., 2000]. Dabei wurde vor allem die Bedeutung der NHR2-Domäne, die für die ETO-Homo- und Heterodimerisierung erforderlich ist, untersucht [Kitabayashi et al., 1998a]. Die Deletion der NHR2-Domäne führte zu einer Verschiebung des Elutionsmaximums in Richtung kleinerer Gewichtskomplexe im Vergleich zum wtAML1-ETO-Protein und spiegelte sich auch in einer reduzierten Repressoraktivität des mutierten AML1-ETO-Proteins wider [Minucci et al., 2000]. Um zu überprüfen, ob neben der NHR2 noch weitere Elemente der CRD die Größe der HMW-Komplexe beeinflussen können und ob es einen Zusammenhang mit den Daten aus den Repressionstests gibt, wurden einige der GAL4-ETO-Deletionsmutanten mittels Größenausschluß-Chromatographie auf ihre Fähigkeit, HMW-Komplexe zu bilden, untersucht (Kapitel 3.4). Dabei wurden GAL4-ETO-Konstrukte, denen Teile der CRD fehlten, wie z. B. die NHR2 (GAL4-ETO Δ 1-236 Δ NHR2) oder die 85 N-terminalen Aminosäuren (GAL4-ETO Δ 1-321), im Vergleich zu GAL4-ETO in Fraktionen mit niedrigerem Molekulargewicht detektiert. Bei diesen beiden Deletionskonstrukten wurde auch eine deutliche Abnahme der Repressorfunktion festgestellt, was dafür spricht, daß die beiden Phänomene, Komplexbildung und Repressorfunktion, miteinander korrelieren. Dies traf auch auf die beiden Konstrukte zu, bei denen die CRD vollständig entfernt worden war und deren Elutionsmaximum in Fraktionen mit niedrigerem Molekulargewicht lag (GAL4-ETO Δ 1-401 bei ca. 500 kDa und GAL4-ETO Δ 1-510 in seiner dimeren Form). Keines der beiden Konstrukte verfügte über deutliche Repressoraktivität. Da selbst das größere der beiden Konstrukte, für das eine Interaktion mit N-CoR nachgewiesen werden konnte, in seiner Komplexbildung sehr stark eingeschränkt war, läßt sich schließen, daß eine Bindung an N-CoR allein weder ausreichend ist, signifikante transkriptionelle Repression zu induzieren, noch hochmolekulare Gewichtskomplexe zu bilden. In diesem Zusammenhang wäre es auch interessant gewesen, zu untersuchen, wie sich die Deletion der C-terminal zur NHR2 lokalisierten Region auf die Komplexbildung auswirken würde. Leider war aber die Expression dieses Konstrukts in 293T-Zellen zu schwach, so daß eine Detektion des Proteins nach dem Säulenlauf aus den 1-ml-Fractionen nicht möglich war. Bei den Konstrukten mit deletierter CRD (GAL4-ETO Δ 1-321 und GAL4-ETO Δ 1-236 Δ C) war die Fähigkeit, an mSin3A zu binden, stark eingeschränkt. Zur Dimerisierung mit ETO waren diese und auch alle anderen Konstrukte mit NHR2 aber in der Lage (siehe Kapitel 3.3). Diese Resultate lassen die Interpretation zu, daß Repressoraktivität und HMW-Komplexbildung nicht nur durch die NHR2-induzierte Dimerisierung, sondern auch durch die Bindungsaffinität von ETO zu mSin3A bestimmt wird. Desweiteren läßt

die Tatsache, daß die Entfernung des Aminoterminus einschließlich NHR1 (Δ AS 1 – 235) sogar schon zu einer beginnenden Destabilisierung des Proteinkomplexes führte, schließen, daß ETO nur in seiner Gesamtheit den größtmöglichen Komplex bilden kann.

4.3 Die Stabilität des Corepressor-Komplexes beruht möglicherweise auf der Interaktion zweier Corepressor-Proteine

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der funktionellen Analyse der verschiedenen Strukturelemente des Corepressors ETO. Es konnte gezeigt werden, daß die Bindungsstelle für mSin3A innerhalb der CRD liegt und daß GAL4-ETO-Konstrukte mit Deletionen innerhalb dieser Region in ihrer Fähigkeit, Transkription zu reprimieren, eingeschränkt waren. Jedoch konnten weder die CRD noch die NHR3+NHR4 (N-CoR-Bindungsstelle) allein maximale Repression induzieren oder die Bildung von HMW-Komplexen bewirken. Daraus läßt sich schließen, daß diese beiden wichtigen Strukturelemente miteinander kooperieren müssen, damit ETO seine optimale Funktion als transkriptioneller Repressor ausüben kann. Die hier vorgestellten Daten stammen zwar aus transienten Transfektionsversuchen und spiegeln möglicherweise nicht die exakte physiologische Situation auf den endogenen chromosomalen Loci wider [Archer et al., 1992], berechtigen aber dennoch zu der Frage, warum die Bindung an ein Corepressor-Molekül allein für ETO nicht ausreicht, um bestmögliche Repression zu erzielen. So ist es vorstellbar, daß der Corepressor-Komplex eine gewisse Stabilität erfordert, die möglicherweise durch eine Interaktion zwischen zwei Corepressor-Proteinen miteinander gewährleistet wird. Daß mehrere miteinander interagierende Untereinheiten zur Regulation transkriptioneller Vorgänge benötigt werden, konnte auch schon für Coaktivator-Komplexe mit Histon-Acetyltransferaseaktivität gezeigt werden [Glass et al., 2000]. Der modulartige Aufbau des ETO-Moleküls eröffnet die Möglichkeit, die Funktion eines oder mehrerer Strukturelemente zu stören, dadurch den Corepressor-Komplex zu destabilisieren und so eine Reduktion der Repressorfunktion zu erzielen.

4.4 Hemmung der ETO-vermittelten Repression – "Proof of principle"

Der abschließende Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Konstruktion von zwei "Aktivator-Proteinen", die die GAL4-ETO-induzierte Repression inhibieren sollten (Kapitel 3.5). Da es sich bei ETO um einen starken Transkriptionsrepressor handelt, wurde ein Ansatz gewählt, der nicht nur auf die Blockierung einer einzelnen funktionellen Domäne abzielte, sondern der durch Verwendung einer Transaktivierungsdomäne eine zusätzliche Dereprimierung von AML1-ETO-Zielgenen beabsichtigte. Aus diesem Grund wurden die Proteine aus einer ETO-bindenden Domäne und einer Aktivierungsdomäne (AD) aufgebaut. Als ETO-bindende Domäne wurde die Region NHR2+C (= NC) gewählt, weil diese sehr gut mit ETO dimerisieren, aber nur sehr schlecht an mSin3A binden konnte. Letzteres ist sehr wichtig, um zu verhindern, daß weitere Interaktionen mit mSin3A stattfinden, die noch zusätzliche Repressoraktivität mit in den Komplex bringen könnten. Auf der Suche nach geeigneten Kandidaten für die Transaktivierungsdomäne fiel die Wahl auf die Aktivierungsdomäne des "Herpes simplex Virus"-Proteins VP16. Diese ist als starker transkriptioneller Aktivator der frühen viralen Genexpression bekannt [O'Hare, 1993]. Mit ihren 78 Aminosäuren wäre sie allerdings für eine Verwendung in einem zellgängigen Peptid viel zu groß. Aus diesem Grund und zu Vergleichszwecken wurde noch eine zweite Transaktivierungsdomäne, und zwar das "KIX domain binding peptide (KBP) 2.20" ausgewählt. Für dieses 8 Aminosäuren große synthetische Peptid wurde eine Interaktion mit den Coaktivator-Proteinen p300/CBP nachgewiesen und außerdem gezeigt, daß es – an eine DNA-Bindungsdomäne gekoppelt – die Genexpression aktivieren kann [Frangioni et al., 2000]. Die beiden Aktivierungsdomänen wurden also an die NC-Domäne fusioniert, mit einem Kernlokalisierungssignal (NLS) sowie einem FLAG-Epitop versehen und die resultierenden Konstrukte, NC-VP16 und NC-KBP, zunächst im *In-vitro*-Repressionstest untersucht.

Durch Cotransfektion von GAL4-ETO mit NC-VP16 wurde ein Wiederanstieg der Luziferaseaktivität auf annähernd die Werte von GAL4 allein erreicht. Die Tatsache, daß das Fusionsprotein NC-VP16, nicht aber die NC-Domäne oder die VP16-Aktivierungsdomäne allein einen dereprimierenden Effekt auf die GAL4-ETO-vermittelte Repression ausübten, demonstriert die Notwendigkeit beider Domänen. Immerhin wäre es ja auch vorstellbar gewesen, daß schon die NC-Domäne allein durch Blockierung der mSin3A-Bindungsstelle zu einer Abnahme der Repression führt. Ebenso wird deutlich, daß die VP16-AD nur dann eine Verringerung der Repression

bewirken kann, wenn sie mit Hilfe der NC-Domäne an den "Ort des Geschehens" rekrutiert wird. Um nachzuweisen, daß NC-VP16 spezifisch nur auf die GAL4-ETO-induzierte Repression wirkt, wurde es zusammen mit einem anderen transkriptionsreprimierendem Protein, der Repressor-Domäne I von N-CoR (GAL4-N-CoR1), coexprimiert. Erwartungsgemäß hatte NC-VP16 hier keinen Einfluß auf die Repression. Die Spezifität von NC-VP16 für ETO ist eine Grundvoraussetzung für weitergehende Experimente, denn ein möglicher Einfluß auf andere als von AML1-ETO reprimierte Zielgene wäre absolut unerwünscht. Das zweite Protein, von dem transkriptionsaktivierende Eigenschaften erhofft wurden, NC-KBP, war dagegen nicht in der Lage, die GAL4-ETO-vermittelte Repression zu reduzieren. Möglicherweise ist das Transaktivierungspotential des Peptids im Vergleich zu dem der VP16-Domäne nicht ausreichend. Vielleicht ist aber auch das Fusionsprotein NC-KBP trotz des Glycin-Serin-Spacers zwischen den beiden funktionellen Domänen so ungünstig gefaltet, daß es zu einer sterischen Hinderung der Aktivierungsdomäne kommt. Da dieses Konstrukt schon im *In-vitro*-Repressionstest keine Wirkung zeigte, wurde es nicht weiter untersucht. Dagegen sollte ein Konstrukt, das in diesem Testsystem wie NC-VP16 die ETO-induzierte Repression effizient hemmen kann, auch in der Lage sein, einen Einfluß auf die Transkription physiologisch relevanter Zielgene von AML1-ETO auszuüben und damit möglicherweise den Differenzierungsblock zu überwinden. Das "Aktivator-Konstrukt" NC-VP16 wurde aus diesem Grund zur weiteren Analyse in den retroviralen Vektor PINCO kloniert, um damit die physiologische Wirkung in Zelllinien zu prüfen. Besonders auffällig war, daß sich der Anteil der mit PINCO-NC-VP16 transduzierten Kasumi-1-Zellen über den 8 Tage andauernden Versuchszeitraum auf ca. 1/3 des Ausgangswertes verringerte. Dieses Phänomen war bei Kasumi-1-Zellen, die mit PINCO allein transduziert wurden, nicht zu beobachten. Bei den Jurkat-Zellen veränderte sich der Anteil der mit PINCO bzw. PINCO-NC-VP16 transduzierten Zellen über den Versuchszeitraum nicht deutlich. Dies könnte darauf hindeuten, daß es sich um einen spezifischen Effekt des NC-VP16-Proteins auf AML1-ETO exprimierende Zellen handelt. Eine eindeutige Beantwortung dieser Frage steht jedoch noch aus.

4.4.1 Lösungsvorschläge

Bei dem Versuch zu klären, ob das im Repressionstest wirksame "Aktivator-Konstrukt" NC-VP16 auch in AML1-ETO-exprimierenden Zellen eine spezifische Funktion ausüben kann, sind im wesentlichen zwei Probleme aufgetreten: Die Kasumi-1-Zellen

ließen sich mit dem gewählten retroviralen Vektor "PINCO" nur zu einem geringen Anteil transduzieren und der Anteil transduzierter Zellen (gemessen an der EGFP-Expression) nahm innerhalb kurzer Zeit so stark ab, daß das Differenzierungsverhalten dieser Zellen nicht untersucht werden konnte. Zur Überwindung dieser Probleme wird zur Zeit ein neuer Vektor entwickelt. Dabei handelt es sich um einen lentiviralen Vektor, mit dem in Vorversuchen in Kasumi-1-Zellen eine Transduktionsrate von über 60 % erzielt werden konnte. In diesen Vektor soll nun eine regulatorische Kasette eingebaut werden, mit deren Hilfe die Expression von NC-VP16 gezielt induziert werden kann. Damit soll verhindert werden, daß mit NC-VP16 transduzierte Zellen kurz nach der Transduktion absterben, falls das Protein tatsächlich einen toxischen Effekt haben sollte. Die regulatorische Kasette stammt aus dem "ARGENT™ Regulated Transcription Retrovirus Kit" der Firma ARIAD und basiert auf dem folgenden Prinzip (Abb. 36):

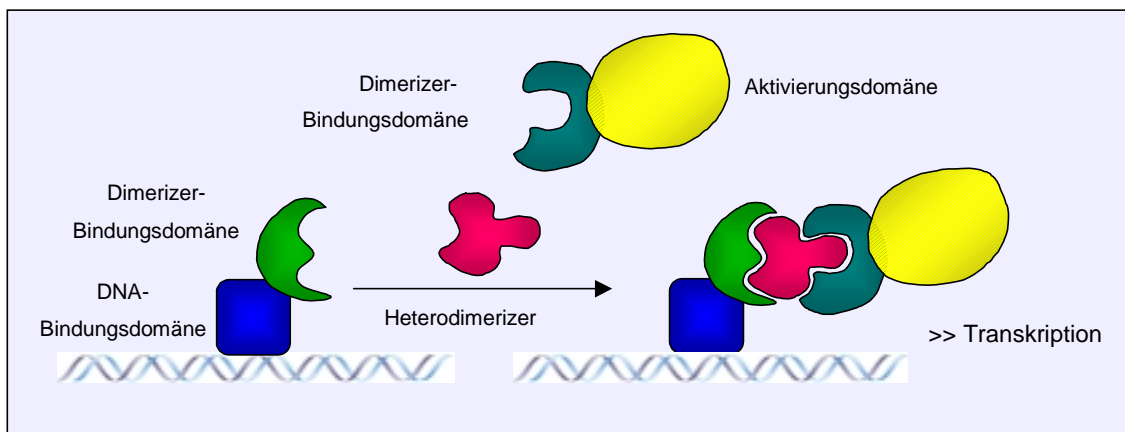


Abb. 37: Kontrollierte Genexpression durch Regulation der Transkription [ARIAD Pharmaceuticals Inc., Cambridge, MA]. Erläuterungen im Text.

Die Strategie dieses Kits beruht auf der Verwendung von kleinen chemischen Molekülen, sog. "Chemical inducers of dimerization" oder "Dimerizers", die eine Interaktion von Proteinen induzieren können. Diese zellpermeablen Moleküle verfügen über verschiedene Motive, die jeweils mit hoher Affinität an ein bestimmtes Proteinmodul (Dimerizer-Bindungsdomäne) binden können. Indem solche Module an eine DNA-Bindungsdomäne und eine Aktivierungsdomäne fusioniert werden, kann ein funktioneller Transkriptionsfaktor gebildet werden, sofern eine Interaktion der beiden Domänen durch Zugabe des "Dimerizers" ermöglicht wird. Durch Einbau des NC-VP16-Gens in die regulatorische Kasette wird dessen Expression unter die Kontrolle des Dimerizers gebracht und kann nun gezielt induziert werden. Da der Vektor neben den genannten Elementen auch über einen Selektionsmarker (Neomycin-

Resistenzgen) verfügt, kann zunächst eine Selektion auf transduzierte Zellen stattfinden. So könnten verschiedene resistente Zellklone generiert werden, die dann auf ihre Induzierbarkeit hin getestet werden würden. Würde bei der Mehrheit der getesteten Klone die Zugabe des Dimerizers und damit Induktion der NC-VP16-Expression zum Absterben der Zellen führen, würde dies für eine physiologische Antwort des NC-VP16-Proteins auf AML1-ETO exprimierende Zellen sprechen.

Darüber hinaus könnte die biologische Bedeutung von NC-VP16 auf AML1-ETO-exprimierende Zellen auch noch in anderen Systemen überprüft werden: Dafür eignen würde sich die promonozytäre Zelllinie U937, bei der sich durch Zugabe von Vitamin D₃ und TGFβ die Differenzierung der Zellen stimulieren lässt, was in einer CD14-Expression resultiert [Gelmetti et al., 1998]. Es existieren bereits U937-Zellen, die einen AML1-ETO-Expressionsvektor stabil integriert haben, wobei die Expression des Fusionsgens unter der Kontrolle eines Zink-induzierbaren Promotors steht. Diese Zellen könnten zusätzlich mit NC-VP16 transduziert werden und nach Induktion der AML1-ETO-Expression könnte das Differenzierungsverhalten der Zellen untersucht werden. Ein weiteres Testsystem zur Überprüfung der therapeutischen Wirkung von NC-VP16 bieten NIH3T3-Zellen, die mit AML1-ETO transduziert wurden. Die Expression von AML1-ETO allein führt in diesen Zellen zur Transformation. Die transformierten Zellen bilden im Gegensatz zu nicht transformierten wt-Zellen Kolonien im Soft-Agar [Frank et al., 1999]. Bei einem vorhandenen therapeutischen Effekt des NC-VP16-Proteins sollte die Expression von NC-VP16 in den 3T3-AML1-ETO-Zellen zu einer deutlichen Verringerung des Koloniewachstums führen.

4.5 Mögliche Therapieansätze für die Behandlung von Leukämien in der Zukunft

Neben der Weiterentwicklung der klassischen Therapieformen zur Behandlung von Leukämien werden in Zukunft vermehrte Anstrengungen bei der Entwicklung von "molekularen Therapieformen" unternommen. Da bei einem Großteil der Leukämien funktionell veränderte Transkriptionsfaktoren an der Krankheitsentstehung beteiligt sind, wird die "Transkriptions-Therapie" mit großer Wahrscheinlichkeit zunehmend an Bedeutung gewinnen. Dabei sind prinzipiell zwei Strategien denkbar: (i) die Funktion eines veränderten Transkriptionsfaktors direkt zu blockieren oder (ii) relevante Zielgene des veränderten Transkriptionsfaktors zu reprimieren bzw. dereprimieren [Pandolfi, 2001]. Da im zweiten Fall nur auf einige ausgewählte Zielgene eingewirkt werden

würde, sollte diese Art der Intervention zu hoch spezifischen therapeutischen Effekten mit geringer oder keiner Toxizität für den Gesamtorganismus führen.

Ein großes Potential der Transkriptions-Therapie liegt sicherlich in der Weiterentwicklung der Histondeacetylase-Inhibitoren. Aber auch die Suche nach therapeutischen Peptiden mit Hilfe geeigneter Screeningsysteme und Peptidbibliotheken scheint aussichtsreich zu sein. Abschließend sei noch auf die Gruppe der Polyamid-Konjugate verwiesen: hierbei handelt es sich um synthetische Transkriptionsfaktoren, die aus einem Polyamid, das über einen flexiblen Polyether-Linker an eine minimale Aktivierungsdomäne gekoppelt ist, bestehen. Über den Polyamidanteil können diese Moleküle spezifisch an bestimmte DNA-Sequenzen binden und mittels der Aktivierungsdomäne die Genexpression induzieren [Mapp et al., 2000].

5 Zusammenfassung

In ca. 40 % der Fälle mit akuter myeloischer Leukämie vom Typ M₂ (AML-M₂) findet man die Translokation t(8;21) (q22;q22), bei der es zur Fusion der DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors AML1 mit einem starken transkriptionellen Repressor, ETO, kommt. ETO interagiert mit Corepressoren wie N-CoR und mSin3A und bildet mit diesen Komplexen, die Histondeacetylaseaktivität enthalten, was zu transkriptioneller Repression von relevanten AML1-Zielgenen führt und so maßgeblich zu dem in den leukämischen Blasten vorliegenden Differenzierungsblock beiträgt.

Um Regionen in ETO zu identifizieren, die transkriptionelle Repression vermitteln, wurde eine Serie von GAL4-ETO-Deletionskonstrukten entwickelt, die in einem transienten Testsystem auf ihre Fähigkeit, die Transkription von einem Luziferase-Reporterkonstrukt aus zu reprimieren, untersucht wurden. Dabei stellte sich heraus, daß die Entfernung der ersten 236 N-terminalen Aminosäuren keinen Einfluß auf die Repressoraktivität des Proteins hatte. Eine weitere Deletion der nächsten 85 Aminosäuren resultierte jedoch in einer drastischen Beeinträchtigung der Repressorfunktion und in einer verminderten Bildung von hochmolekularen Gewichtskomplexen (HMW-Komplexen). Darüber hinaus wurde eine 196 Aminosäuren umfassende Domäne identifiziert, die die NHR2-Domäne und die daran angrenzenden C- und N-terminal gelegenen Bereiche beinhaltet. Diese sogenannte "Core repressor domain" (CRD) bindet an mSin3A und vermittelt transkriptionelle Repression unabhängig von N-CoR. Durch Größenausschlußchromatographie ("size exclusion chromatography", SEC) konnte gezeigt werden, daß GAL4-ETO als Bestandteil eines hochmolekularen Gewichtskomplexes (HMW-Komplexes) vorliegt. Die Untersuchung einer Auswahl von GAL4-ETO-Deletionsmutanten ergab, daß ihre Fähigkeit, Transkription zu reprimieren, mit der Größe und Stabilität des von ihnen gebildeten HMW-Komplexes korreliert. Auffällig war hier, daß ETO-Konstrukte, denen bestimmte strukturelle Elemente der CRD fehlten, Komplexe mit niedrigerem molekularem Gewicht bildeten. Die aus der Struktur funktionsanalyse gewonnenen Daten lassen schließen, daß es sich bei ETO um ein Protein mit modulartigem Aufbau handelt, wobei mehrere Regionen miteinander kooperieren, um maximale transkriptionelle Repression zu induzieren.

Aufbauend auf diesen Daten wurden zwei "interferierende" Moleküle entworfen, die sich jeweils aus der NHR2+C-Domäne (NC) und einer Transaktivierungsdomäne zusammensetzten. Eines der beiden Proteine, NC-VP16, war in der Lage, im *In-vitro*-

Repressionstest, die durch ETO vermittelte transkriptionelle Repression spezifisch zu hemmen. Für dieses Protein wurde auch eine spezifische Interaktion mit ETO durch Coimmunpräzipitation nachgewiesen. Um seine Wirkung in Zelllinien zu testen, wurde es in einen retroviralen Vektor kloniert, mit dem Kasumi-1-Zellen, die die t(8;21) tragen und somit endogenes AML1-ETO exprimieren, transduziert wurden. Dies führte innerhalb des über acht Tage andauernden Versuchszeitraums zu einer drastischen Abnahme der mit NC-VP16 transduzierten Zellen, während der Anteil der mit dem leeren Vektor allein transduzierten Zellen konstant blieb. Im Gegensatz dazu war bei der T-Zell-Leukämie-Zelllinie Jurkat, die nicht über endogenes AML1-ETO verfügt, dieser Unterschied nicht feststellbar. Dies könnte dafür sprechen, daß das NC-VP16-Protein spezifisch auf AML1-ETO exprimierende Zellen wirkt.

6 Literaturverzeichnis

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1995): Molekularbiologie der Zelle. 3. Auflage. VCH Verlagsgesellschaft Weinheim

Amann JM, Nip J, Strom DK, Lutterbach B, Harada H, Lenny N, Downing JR, Meyers S, Hiebert SW (2001): ETO, a target of t(8;21) in acute myeloid leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain. *Mol Cell Biol* **21**: 6470

Archer TK, Lefebvre P, Wolford RG, Hager GL (1992): Transcription factor loading on the MMTV promoter: a bimodal mechanism for promoter activation. *Science* **255**: 1573

Aronson BD, Fisher AL, Blechman K, Caudy M, Gergen JP (1997): Groucho-dependent and -independent repression activities of Runt domain proteins. *Mol Cell Biol* **17**: 5581

Asou H, Tashiro S, Hamamoto K, Otsuji A, Kita K, Kamada N (1991): Establishment of a human acute myeloid leukemic cell line (Kasumi-1) with t(8;21) chromosome translocation. *Blood* **77** : 2031 – 2036

Blanco JC, Minucci S, Lu J, Yang XJ, Walker KK, Chen H, Evans RM, Nakatani Y, Ozato K (1998): The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev* **12**: 1638

Boffa LC, Vivaldi G, Mann RS, Vivaldi G (1978): Suppression of histone deacetylation *in vivo* and *in vitro* by sodium butyrate. *J Biol Chem* **253**: 3364

Bonnet D, Dick JE (1997): Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* **3**: 730

Buchholz F, Refaeli Y, Trumpp A, Bishop JM (2000): Inducible chromosomal translocation of AML1 and ETO genes through Cre/loxP-mediated recombination in the mouse. *EMBO Rep* **1**: 133

Calabi F, Cilli V (1998): CBFA2T1, a gene rearranged in human leukemia, is a member of a multigene family. *Genomics* **52**: 332

Castilla LH, Garrett L, Adya N, Orlic D, Dutra A, Anderson S, Owens J, Eckhaus M, Bodine D, Lui PP (1999): The fusion gene *CBFβ-MYH11* blocks myeloid differentiation and predisposes mice to myelomonocytic leukemia. *Nat Genet* **23**: 144

Cheng T, Shen H, Giokas D, Gere J, Tenen DG, Scadden DT(1996): Temporal Mapping of gene expression levels during the differentiation of individual primary hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 13158

D'Argenio G, Mazzacca G (1996): Butyrate enemas in experimental colitis and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gastroenterology* **110**: 1727

Davis JN, Williams BJ, Herron JT, Galiano FJ, Meyers S (1999): ETO-2, a new member of the ETO-family of nuclear proteins. *Oncogene* **18**: 1375

Dikstein R, Zhou S, Tjian R (1996): Human TAFII 105 is a cell type-specific TFIID subunit related to hTAFII 130. *Cell* **87**: 137

- Erickson P, Gao J, Chang KS, Look T, Whisenant E, Raimondi S, Lasher R, Trujillo J, Rowley J, Drabkin H (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**: 1825
- Erickson PF, Robinson M, Owens G, Drabkin HA (1994): The ETO portion of acute myeloid leukemia t(8;21) fusion transcript encodes a highly evolutionarily conserved, putative transcription factor. *Cancer Res.* **54**:1782
- Erman B, Cortes M, Nikolajczyk BS, Speck NA, Sen R (1998): ETS-core binding factor: a common composite motif in antigen receptor gene enhancers. *Mol Cell Biol* **18**:1322
- Feinstein PG, Kornfeld K, Hogness DS, Mann RS (1995): Identification of homeotic target genes in *Drosophila melanogaster* including nervy, a proto-oncogene homologue. *Genetics* **140**: 573
- Fisher AL, Ohsako S, Caudy M (1996): The WRPY motif of the hairy-related basic helix-loop-helix repressor proteins acts as a 4-amino-acid transcription repression and rotein-protein interaction domain. *Mol Cell Biol* **16**: 2670
- Frangioni JV, LaRiccia LM, Cantley LC, Montminy MR (2000): Minimal activators that bind to the KIS domain of p300/CBP identified by phage display screening. *Nature Biotechnology* **18**: 1080
- Frank RC, Sun X, Berguido FJ, Jakubowiak A, Nimer SD (1999): The t(8;21) fusion protein, AML1/ETO, transforms NIH3T3 cells and activates AP-1. *Oncogene* **18**: 1701
- Frank R, Zhang J, Uchida H, Meyers S, Hiebert SW, Nimer SD (1995): The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B. *Oncogene* **11**: 2667
- Gamon T, Kitamura E, Hosoda F, Shimizu K, Shinohara K, Hayashi Y, Nagase T, Yokoyama Y, Ohki M (1998): The partner gene of AML1 in t(16;21) myeloid malignancies is a novel member of the MTG8(ETO) family. *Blood* **91**: 4028
- Gelmetti V, Zhang J, Fanelli M, Minucci S, Pelicci PG, Lazar MA (1998): Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. *Mol Cell Biol* **18**: 7185
- Glass CK, Rosenfeld MG (2000): The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* **14**: 121
- Glass CK, Rosenfeld MG (2000): The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* **14**: 121
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T (2001): Valproic acid defines a novel class of histone deacetylase inhibitors inducing differentiation of transformed and tumorigenic cells. *EMBO J* **20**: 6969
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) : Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**: 59 – 72, 1977
- Grignani F, Fagioli M, Alcalay M, Longo L, Pandolfi PP, Dotti E, Biondi A, LoCoco F, Pelicci PG (1994): Acute promyelocytic leukemia – From genetics to treatment. *Blood* **83**: 10

Grignani F, Kinsella T, Mencarelli A, Valtieri M, Riganelli D, Grignani F, Lanfrancone L, Peschle C, Nolan GP, Pelicci PG (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**: 14

Grunstein M (1997): Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**: 349

Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57

Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C (1998): A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J* **7**: 1395

Heinzel T, Lavinsky RM, Mullen TM, Soderstrom M, Laherty CD, Torchia J, Yang WM, Brard G, Ngo SD, Davie JR, Seto E, Eisenman RN, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG (1997): A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* **387**: 43

Hernandez-Munain C, Krangel MS (1994): Regulation of the T-cell receptor delta enhancer by functional cooperation between c-Myb and core-binding factors. *Mol Cell Biol* **14**: 473

Hoey T, Weinzierl RO, Gill G, Chen JL, Dynlacht BD, Tjian R (1993): Molecular cloning and functional analysis of *Drosophila* TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell* **72**: 247

Hoffbrand AV, Pettit JE, Hoelzer D (1997): Roche Grundkurs Hämatologie. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin – Wien

Hohaus S, Petrovick MS, Voso MT, Sun Z, Zhang DE, Tenen DG (1995): PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha gene. *Mol Cell Biol* **15**: 5830

Kagoshima H, Shigesada K, Satake M, Ito Y, Miyoshi H, Ohki M, Pepling M, Gergen P (1993): The Runt domain identifies a new family of heteromeric transcriptional regulators. *Trends Genet* **9**: 338

Kamachi Y, Ogawa E, Asano M, Ishida S, Murakami Y, Satake M, Ito Y, Shigesada K (1990): Purification of a mouse nuclear factor that binds to both the A and B cores of the Polyomavirus enhancer. *J Virol* **64**: 4808

Kaneko Y, Kamada N, Ohki M (1993): The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript. *EMBO J* **12**: 2715

Kania MA, Bonner AS, Duffy JB, Gergen JP (1990): The *Drosophila* segmentation gene runt encodes a novel nuclear regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system. *Genes Dev* **4**: 1701

Kijima M, Yoshida M, Sugita K, Horinouchi S, Beppu T (1993): Trapoxin, an antitumor cyclic tetrapeptide, is an irreversible inhibitor of mammalian histone deacetylase. *J Biol Chem* **268**: 22429

Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Lee SW, Moon EJ, Kim HS, Lee SK, Chung HY, Kim CW, Kim KW (2001): Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med* **7**: 437

Kitabayashi I, Ida K, Morohoshi F, Yokoyama A, Mitsuhashi N, Shimizu K, Nomura N, Hayashi Y, Ohki M (1998a): The AML1-MTG8 leukemic fusion protein forms a complex with a novel member of the MTG8 (ETO/CDR) family, MTGR1. *Mol Cell Biol* **18**: 846

Kitabayashi I, Yokoyama A, Shimizu K, Ohki M (1998b): Interaction and functional cooperation of the leukemia-associated factors AML1 and p300 in myeloid cell differentiation. *EMBO J* **17**: 2994

Kouzarides T (1999): Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* **9**: 40

Kwon HJ, Owa T, Hassig CA, Shimada J, Schreiber SL (1998): Depudecin induces morphological reversion of transformed fibroblasts via the inhibition of histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3356

Lagasse E, Weissman IL (1992): Mouse MRP8 and MRP14, two intracellular calcium-binding proteins associated with the development of the myeloid lineage. *Blood* **79**: 1907

Lea MA, Tulsyan N (1995): Discordant effects of butyrate analogues on erythroleukemia cell proliferation, differentiation and histone deacetylase. *Anticancer Res* **15**: 879

Lenny N, Meyers S, Hiebert SW (1995): Functional domains of the t(8;21) fusion protein, AML-1-ETO. *Oncogene* **11**: 1761

Levanon D, Goldstein RE, Bernstein Y, Tang H, Goldenberg D, Stifani S, Paroush Z, Groner Y (1998): Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11590

Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, Bar-Am I, Avivi L, Groner Y (1994): AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. *Genomics* **23**: 425

Lin YS, Ha I, Maldonado E, Reinberg D, Green MR (1991): Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activation region. *Nature* **353**: 569

Liu P, Tarle SA, Hajra A, Claxton DF, Marlton P, Freedman M, Siciliano MJ, Collins FS (1993): Fusion between transcription factor CBF-beta/PEBP2-beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science* **261**: 1041

Look TA (1997): Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* **278**: 1059

Lubbert M, Herrmann F, Koeffler HP (1991). Expression and regulation of myeloid-specific genes in normal and leukemic myeloid cells. *Blood* **77**: 909

Lutterbach B, Hiebert SW (2000): Role of the transcription factor AML-1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation. *Gene* **245**: 223

Lutterbach B, Sun D, Schuetz J, Hiebert SW (1998a): The MYND motif is required for repression of basal transcription from the multidrug resistance 1 promoter by the t(8;21) fusion protein. *Mol Cell Biol* **18**: 3604

Lutterbach B, Westendorf JJ, Linggi B, Patten A, Moniwa M, Davie JR, Huynh KD, Bardwell VJ, Lavinsky RM, Rosenfeld MG, Glass C, Seto E, Hiebert SW (1998b): ETO, a target of t(8;21) in Acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 Corepressors. *Mol Cell Biol* **18**: 7176

Lutterbach B, Westendorf JJ, Linggi B, Seto E, Hiebert SW (2000): A mechanism of transcriptional repression by AML-1, the target of multiple chromosomal translocations in acute leukemia. *J Biol Chem* **275**: 651

Mapp AK, Ansari AZ, Ptashne M, Dervan PB (2000): Activation of gene expression by small molecule transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3930

Martinez-Balbas MA, Bannister AJ, Martin K, Haus-Seuffert P, Meisterernst M, Kouzarides T (1998): The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *EMBO J* **17**: 2886

Melnick AM, Westendorf JJ, Polinger A, Carlile GW, Arai S, Ball HJ, Lutterbach B, Hiebert SW, Licht JD (2000): The ETO protein disrupted in t(8;21)-associated acute myeloid leukemia is a corepressor for the Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein. *Mol Cell Biol* **20**: 2075

Meyers S, Downing JR, Hiebert SW (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**: 6336

Meyers S, Lenny N, Hiebert SW (1995): The t(8;21) fusion protein interferes with AML1-B-dependent transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **15**: 1974

Meyers S, Lenny N, Sun W, Hiebert SW (1993): The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **15**: 1974

Minucci S, Maccarana M, Ciocce M, De Luca P, Gelmetti V, Segalla S, Di Croce L, Giavara S, Matteucci C, Gobbi A, Bianchini A, Colombo E, Schiavoni I, Badaracco G, Hu X, Lazar MA, Landsberger N, Nervi C, Pelicci PG (2000): Oligomerization of RAR and AML1 transcription factors as a novel mechanism of oncogenic activation. *Mol Cell* **5**: 811

Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K (2000): AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 7521

Miyoshi H, Kozu T, Shimizu K, Enomoto K, Maseki N, Kaneko Y, Kamada N, Ohki M (1993): The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript. *EMBO J* **12**: 2715

Miyoshi H, Ohira M, Shimizu K, Mitani K, Hirai H, Imai T, Yokoyama K, Soeda E, Ohki M (1995): Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Res* **23**: 2762

Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M (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 USA* **88**: 10431

Nagata T, Gupta V, Sorce D, Kim WY, Sali A, Chait BT, Shigesada K, Ito Y, Werner MH (1999) Immunoglobulin motif DNA recognition and heterodimerization of the PEBP2/CBF Runt domain in process citation. *Nat Struct Biol*: **6**: 615

Nichols J, Nimer SD (1992). Transcription factors, translocations, and leukemia. *Blood* **80**: 2953

Niki M, Okada H, Takano H, Kuno J, Tani K, Hibino H, Asano S, Ito Y, Satake M, Noda T (1997): Hematopoiesis in the fetal liver is impaired by targeted mutagenesis of a gene encoding a non-DNA binding subunit of the transcription factor, polyomavirus enhancer binding protein 2/core binding factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5697

Niwa-Kawakita M, Miyoshi H, Gotoh O, Matsushima Y, Nishimura M, Shisa H, Ohki M (1995): Cloning and gene mapping of the mouse homologue of the CBFA2T1 gene associated with human acute myeloid leukemia. *Genomics* **29**: 755

Nuchprayoon I, Meyers S, Scott LM, Suzow J, Hiebert S, Friedman AD (1994): PEBP2/CBF, the murine homolog of the human myeloid AML1 and PEBP2 beta/CBF beta proto-oncoproteins, regulates the murine myeloperoxidase and neutrophil elastase genes in immature myeloid cells. *Mol Cell Biol* **14**: 5558

Nucifora G, Rowley JD (1995): AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia. *Blood* **86**: 1

O'Hare P (1993): The virion transactivator of herpes simplex virus. *Semin Virol* **4**: 145

Ogawa E, Maruyama M, Kagoshima H, Inuzuka M, Lu J, Satake M, Shigesada K, Ito Y (1993): PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila* Runt gene and the human AML1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 6859

Okuda T, Cai Z, Yang S, Lenny N, Lyu CJ, van Deursen JM, Harada H, Downing JR (1998): Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors. *Blood* **91**: 3134

Orkin SH (1995). Transcription factors and hematopoietic development. *J Biol Chem* **270**: 4955

Pandolfi PP (2001): Transcription therapy for cancer. *Oncogene* **20**: 3116

Paranjape SM, Kamakaka RT, Kadonaga JT (1994): Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* **63**: 265

Paslier D, Berger R, Bernard OA (1995): The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood* **85**: 3662

Pazin MJ, Kadonaga JT (1997): What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* **89**: 325 – 328

Petrovick MS, Hiber SW, Friedman AD, Hetherington CJ, Tenen DG, Zhang DE (1998): Multiple functional domains of AML1: PU.1 and C/EBP α synergize with different regions of AML1. *Mol Cell Biol* **18**: 3915

Prosser HM, Wotton D, Gegonne A, Ghysdael J, Wang S, Speck NA, Owen MJ (1992): A phorbol ester response element within the human T-cell receptor beta-chain enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9934

Rabbitts TH (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* **372**: 143

Redondo JM, Pfohl JL, Hernandez-Munain C, Wang S, Speck NA, Krangel MS (1992): Indistinguishable nuclear factor binding to functional core sites of the T-cell receptor delta and murine leukemia virus enhancers. *Mol Cell Biol* **12**: 4817-23

Rhoades KL, Hetherington CJ, Harakawa N, Yergeau DA, Zhou L, Liu LQ, Little MT, Tenen DG, Zhang DE (2000): Analysis of the role of AML1-ETO in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model. *Blood* **96**: 2108

Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA (1998): A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3003

Sadowski I, Ma J, Triezenberg S, Ptashne M (1998): GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* **335**: 563

Sasaki K, Yagi H, Bronson RT, Tominaga K, Matsunashi T, Deguchi K, Tani Y, Kishimoto T, Komori T (1996): Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12359

Schneider U, Schwenk, HU, Bornkamm G (1977): Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* **19**: 621

Schreiber-Agus N, Chin L, Chen K, Torres R, Rao G, Guida P, Skoultchi AI, DePinho RA (1995): An amino-terminal domain of Mxi1 mediates anti-Myc oncogenic activity and interacts with a homolog of the yeast transcriptional repressor SIN3. *Cell* **80**: 777

Shapiro LH, Look AT (1995): Transcriptional Regulation in myeloid cell differentiation. *Curr Opin Hematol* **2**: 3

Shivdasani RA, Orkin SH (1996). The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* **87**: 4025

Strahl BD, Allis CD (2000): The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41

Stringer KF, Ingles CJ, Greenblatt J (1990): Direct and selective binding of an acidic transcriptional activation domain to the TATA-box factor TFIID. *Nature* **345**: 783

Sun W, Graves BJ, Speck NA (1995): Transactivation of the Moloney murine leukemia virus and T-cell receptor β -chain enhancers by Cbf and Ets requires intact binding sites for both proteins. *J. Virol* **69**: 4941

Suzow J, Friedman AD (1993): The murine myeloperoxidase promoter contains several functional elements, one of which binds a cell type-restricted transcription factor, myeloid nuclear factor 1 (MyNF1). *Mol Cell Biol* **13**: 2141

Takahashi A, Satake M, Yamaguchiiwai Y, Bae SC, Lu J, Maruyama M, Zhang YW, Oka H, Arai N, Arai K, Ito Y (1995): Positive and negative regulation of granulocyte-

macrophage colony-stimulating factor promoter activity by AML1-related transcription factor, PEBP2. *Blood* **86**: 607

Tanaka K, Tanaka T, Ogawa S, Kurokawa M, Mitani K, Yazaki Y, Hirai H (1995): Increased expression of AML1 during renoic-acid-induced differentiation of U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **211**: 1023

Tanaka T, Tanaka K, Ogawa S, Kurokawa M, Mitani K, Nishida J, Shibata Y, Yazaki Y, Hirai H (1995): An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms. *EMBO J* **14**: 341

Tanese N, Sluja D, Vassallo MF, Chen JI, Admon A (1996): Molecular cloning and analysis of two subunits of the human TFIID complex: hTAF130 and hTAF100. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 13611

Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE (1997): Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* **90**: 489

Torchia J, Glass C, Rosenfeld MG (1998): Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 373

Tse C, Sera T, Wolffe AP, Hansen JC (1998): Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* **18**: 4629

Uchida H, Zhang J, Nimer SD (1997): AML1A and AML1B can transactivate the human IL-3 promoter. *J Immunol* **158**: 2251

Ura K, Kurumizaka H, Dimitrov S, Almouzni G, Wolffe AP (1997): Histone acetylation: Influence on transcription, nucleosome mobility and positioning, and linker histone-dependent transcriptional repression. *EMBO J* **16**: 2096

Velazquez OC, Jabbar A, De Matteo RP, Rombeau JL (1996): Butyrate inhibits seeding and growth of colorectal metastases to the liver in mice. *Surgery* **120**: 440

Wagener C (1999): *Molekulare Onkologie – Entstehung und Progression maligner Tumoren. 2., aktualisierte und erweiterte Auflage.* Georg Thieme Verlag Stuttgart – New York

Walia H, Chen HY, Sun JM, Holth LT, Davie JR (1998): Histone acetylation is required to maintain the unfolded nucleosome structure associated with transcribing DNA. *J Biol Chem* **273**: 14516

Wang J, Hoshino T, Redner RL, Kajigaya S, Liu JM (1998): ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 10860

Wang J, Wang M, Liu JM (1997): Transformation properties of the ETO gene, fusion partner in t(8;21) leukemias. *Cancer Res* **57**: 2951

Wang JX, Sauntharajah Y, Redner RL, Liv JM (1999) Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of AML1-ETO leukemia cells. *Cancer Res* **59**: 2766

Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA (1996a): Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3444

Wang Q, Stacy T, Miller JD, Lewis AF, Gu TL, Huang X, Bushweller JH, Bonies JC, Alt FW, Ryan G, Liu PP, Wynshwaw-Boris A, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA (1996b): The CBF β subunit is essential for CBF α 2 (AML1) function in vivo. *Cell* **87**: 697

Wang S, Wang Q, Crute BE, Melnikova IN, Keller SR, Speck NA (1993): Cloning and characterization of subunits of the T-cell receptor and murine leukemia virus enhancer core-binding factor. *Mol Cell Biol* **13**: 3324

Wargnier A, Legros-Maida S, Bosselut R, Bourge JF, Lafaurie C, Ghysdael CJ, Sasportes M, Paul P (1995): Identification of human granzyme B promoter regulatory elements interacting with activated T-cell-specific proteins: implication of Ikaros and CBF binding sites in promoter activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. **92**: 6930

Warrell RP, He LZ, Richon V, Calleja E, Pandolfi PP (1998): Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J Nat Cancer Inst* **90**: 1621

Westendorf JJ, Yamamoto CM, Lenny N, Downing JR, Selsted ME, Hiebert SW (1998): The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP α , inhibits C/EBP α -dependent transcription and blocks granulocytic differentiation. *Mol Cell Biol* **18**: 322

Wong CW, Privalsky ML (1998): Transcriptional repression by the SMRT-mSin3 corepressor: multiple interactions, multiple mechanisms, and a potential role for TFIIB. *Mol Cell Biol* **18**: 5500

Xiao H, Pearson A, Coulombe B, Truant R, Zhang S, Regier JL, Triezenberg SJ, Reinberg D, Greenblatt J (1994): Binding of basal transcription factor TFIIH to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol Cell Biol* **14**: 7013

Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T (1990): Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *J Biol Chem* **265**: 17174

Yuan Y, Zhou L, Miyamoto T, Iwasaki H, Harakawa N, Hetherington CJ, Burel SA, Lagasse E, Weissman IL, Akashi K, Zhang DE (2001): AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 10398

Zhang DE, Fujioka KI, Hetherington CJ, Shapiro LH, Chen HM, Look AT, Tenen DG (1994): Identification of a region which directs the monocytic activity of the colony-stimulating factor 1 (macrophage colony-stimulating factor) receptor promoter and binds PEBP2/CBF (AML1). *Mol Cell Biol* **14**: 8085

Zhang DE, Hetherington CJ, Meyers S, Rhoades KL, Larson CJ, Chen HM, Hiebert SW, Tenen DG (1996): CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP) and AML1 (CBF α 2) synergistically activate the macrophage colony-stimulating factor receptor promoter. *Mol Cell Biol* **16**: 1231

Zhang J, Hug BA, Huang EY, Chen CW, Gelmetti V, Maccarana M, Minucci S, Pelicci PG, Lazar MA (2001): Oligomerization of ETO is obligatory for corepressor interaction. *Mol Cell Biol* **21**: 156

Zhu X, Yeadon JE, Burden SJ (1994): AML1 is expressed in skeletal muscle and is regulated by innervation. *Mol Cell Biol* **14**: 8051

7 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------|---|
| ALL | Akute lymphatische Leukämie |
| AML | Akute myeloische Leukämie |
| AML1 | Acute myeloid leukemia 1 |
| Amp | Ampicillin |
| AS | Aminosäure |
| ATRA | all-trans retinoic acid |
| BGH | bovine growth hormone |
| bps | Basenpaare |
| C/EBP | CCAAT/enhancer binding protein |
| CBF β | core binding factor β |
| CBP | CREB-binding protein |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CIP | Calf Intestine Phosphatase |
| CLL | Chronisch-lymphatische Leukämie |
| CML | Chronisch-myeloische Leukämie |
| CMV | Cytomegalovirus |
| CRD | Core Repressor Domain |
| CREB | cyclic AMP-responsive element-binding protein |
| DBD | DNA-Bindungsdomäne |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagles Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| dNTP | Desoxynucleotidtriphosphate |
| DTT | Dithiothreitol |
| EBNA | Epstein-Barr-Kernantigen |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |
| ECL | enhanced chemiluminescence |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGFP | Enhanced green fluorescence protein |
| <i>env</i> | envelope, Hüllprotein |
| ETO | Eight-Twenty-One |
| FACS | Durchflußcytometer |
| FCS | Fötale Kälberserum |
| g | Gramm |

| | |
|------------|--|
| G418 | Geneticin |
| <i>gag</i> | gruppenspezifisches Antigen |
| GAL4 | hefespezifischer Transkriptionsfaktor (für die Regulation des Galactosidase-Stoffwechsels) |
| GaLV | Gibbon ape leukemia virus |
| GM-CSF | Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| GvL | Graft versus-leukemia-effect |
| h | Stunde |
| HBS | HEPES buffered saline |
| HBSS | Hank's gepufferte Salzlösung |
| HDAC | Histondeacetylase |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin N-2-Ethansulfonsäure |
| HLA | humanes Leukocytenantigen |
| HMW | hochmolekulare Gewichtskomplexe |
| hu | human |
| Ig | Immunglobulin |
| IL-3 | Interleukin-3 |
| IP | Immunpräzipitation |
| KBP | KIX domain binding peptide |
| kDa | Kilodalton |
| KMT | Knochenmarkstransplantation |
| LB-Medium | Luria-Bertani-Medium |
| LTR | long terminal repeats |
| M | molar |
| M-CSF | Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor |
| mg | Milligramm |
| µg | Mikrogramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| µg | Mikroliter |
| MLC | mixed leukocyte cultures |
| mSin3 | mammalian SIN3 |

| | |
|------------|---|
| MTG8 | Myeloid Transforming Gene 8 (Synonym für ETO) |
| MTGR1 | MTG8-related protein |
| MW | Molekulargewicht |
| N-CoR | nuclear receptor corepressor |
| Neo | Neomycinphosphotransferase |
| ng | Nanogramm |
| NHR | Nervy Homology Region |
| NLS | Kernlokalisierungssignal |
| OD | Optische Dichte |
| PAH | paired amphipathic helix |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PEBP | Polyoma Enhancer Binding Protein |
| PLZF | Promyelocytic Leukemia Zinc Finger |
| PML | Promyelozyten-Leukämie |
| <i>pol</i> | retrovirales Gen, das die Proteine Transkriptase und Integrase codiert |
| poly A | Polyadenylierungssignal |
| PST | Prolin/Serin/Threonin |
| Puro | Puromycin-Resistenzgen |
| RAR | Retinsäure-Rezeptor |
| rh | rekombinant human |
| rhd | <i>runt</i> -Homologie-Domäne |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| rpm | rounds per minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SANT | SANT <u>S</u> WI3, <u>A</u> DA2, <u>N</u> -CoR and <u>I</u> FIIB DNA-bindende Domäne |
| SCID | Severe Combined Immune Deficiency |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec | Sekunde |
| SEM | standard errors of means |
| SV40 | simian virus 40 |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TCR | T-Zell-Rezeptor |
| TE | Tris-EDTA |

| | |
|-------|---|
| TEL | Gen, das einen TF der ETS-Familie codiert |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| TF | Transkriptionsfaktor |
| TK | Thymidinkinase |
| TPX | Trapoxin |
| Tris | 2-Amino-2-Hydroxymethylpropan-1,3-diol |
| TSA | Trichostation A |
| TU | transducing units |
| U | Units |
| Ü/N | über Nacht |
| UAS | upstream activating sequence |
| V | Volt |
| Vol | Volumen |
| VPA | Valproinsäure |
| WB | Western Blot |

Daten aus dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Hildebrand, D., Tiefenbach, J., Heinzl, T., Grez, M., and Maurer, A. B.: **Multiple Regions of ETO Cooperate in Transcriptional Repression.** The Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, No. 13, pp. 9889 – 9895, 2001

Kongreßbeiträge:

Hildebrand, D., Maurer, A. B., and Grez, M.: **Transformation of TF-1 Cells with Retroviral Vectors containing AML1b or AML1/MTG8.** Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen und Österreichischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Frankfurt am Main, 25. – 28. Oktober 1998

Hildebrand, D., Schüle, S. B., Tiefenbach, J., Heinzl, T., Grez, M., and Maurer, A. B.: **A Core Repressor Domain in AML1/ETO Interacts with Sin3A and is Required for Transcriptional Repression.** 6th Meeting of the European Haematology Association, Frankfurt am Main, 21. – 24. Juni 2001

Hildebrand, D., Schüle, S. B., Tiefenbach, J., Heinzl, T., Grez, M., and Maurer, A. B.: **A Core Repressor Domain in AML1/ETO is Required for Interaction with Sin3A and Transcriptional Repression.** 30th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology, Tokio, 25. – 28. August 2001

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Chemotherapeutischen Forschungsinstitut, Georg-Speyer-Haus, in Frankfurt am Main in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. M. Grez angefertigt.

Frau Prof. A. Starzinski-Powitz möchte ich herzlich für die freundliche und fachübergreifende Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Biologie und Informatik der J. W. Goethe-Universität danken.

Frau PD Dr. B. Schnierle danke ich sehr für ihre Bereitschaft, das Zweitgutachten dieser Arbeit anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. M. Grez für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Übernahme der Betreuung im Georg-Speyer-Haus. Seine fachliche Unterstützung war für die Durchführung dieser Arbeit unverzichtbar.

Herrn Dr. A. B. Maurer danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit und seine Diskussionsbereitschaft. Außerdem möchte ich ihm für seine optimistische Einstellung und für die kreativen Beiträge beim Schreiben der Veröffentlichung danken.

Herrn Dr. T. Heinzl danke ich sehr für die gute Kooperation, viele wertvolle fachliche Anregungen und die Überlassung zahlreicher Plasmide.

Herrn Dr. S. Stein und Herrn C. Herder danke ich für die hilfreichen Korrekturvorschläge bei der Durchsicht dieser Arbeit.

Ich danke allen Mitgliedern der AG Dr. Grez für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Besonders danken möchte ich Silke Schüle für die enge und kameradschaftliche Zusammenarbeit am AML1-ETO-Projekt und Stefan Stein für seine vielen praktischen Ratschläge. Hana Kunkel danke ich herzlich für die "psychologische Betreuung" im Labor. Bei Christian Herder, Kristin Junker, Silke Schüle und Anja Lüdemann möchte ich mich für die freundschaftliche Atmosphäre im Laboralltag und darüber hinaus bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre liebevolle Unterstützung, ihre Zuversicht und ihr Vertrauen.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Daniela Hildebrand
Geburtsdatum: 20.11.1970
Geburtsort: Offenbach am Main
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1977 – 1981 Geschwister-Scholl-Schule (Grundschule), Mühlheim
1981 – 1983 Goetheschule (Förderstufe), Mühlheim
1983 – 1990 Friedrich-Ebert-Gymnasium, Mühlheim
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

1990 – 1992 Zweijährige Ausbildung an der Berufsfachschule für
Fremdsprachensekretariat, Theodor-Heuss-Schule,
Offenbach am Main

Hochschulstudium

10/92 – 04/98 Biologie-Studium an der J. W. Goethe-Universität,
Frankfurt am Main, mit den Schwerpunkten
Anthropologie und Humangenetik, Mikrobiologie und
Biochemie; Diplomprüfung im April/Mai 1997

06/97 – 04/98 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. M. Grez im
Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main; Betreuung
durch Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz,
Fachbereich Biologie der J. W. Goethe-Universität,
Frankfurt am Main

06/98 – 09/01 Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Dr. M. Grez im
Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main
