

Funktionelle Analyse des MLH1•ITGA9 Fusionsproteins einer Lynch-Syndrom-Familie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität Frankfurt am Main

von

Jenny Hsieh
aus Schwetzingen

Frankfurt 2011

(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie (FB14)
der Goethe-Universität Frankfurt am Main als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. Rolf Marschalek

Gutachter: Prof. Dr. Theodor Dingermann

Datum der Disputation:

Meinen Eltern,
meinem Bruder
und Veit

Inhaltsverzeichnis

INHALTVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
TABELLENVERZEICHNIS.....	V
<u>1 ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>1</u>
<u>2 EINLEITUNG</u>	<u>3</u>
2.1 KOLOREKTALE TUMOREN.....	3
2.1.1 EPIDEMIOLOGIE	3
2.1.2 EINTEILUNG DER KOLOREKTALKARZINOME	4
2.1.3 KOLOREKTALE TUMORGENESE	5
2.2 HNPCC / LYNCH SYNDROM	11
2.2.1 EPIDEMIOLOGIE	11
2.2.2 GESCHICHTE.....	11
2.2.3 CHARAKTERISTIKA	12
2.2.4 DIAGNOSE	13
2.3 DAS MISMATCH-REPARATURSYSTEM	16
2.3.1 MISMATCH-REPARATURSYSTEM UND LYNCH-SYNDROM	20
2.4 MLH1	21
2.5 BRCA1.....	24
2.5.1 MLH1 UND BRCA1.....	26
2.6 INTEGRINE.....	27
2.7 ITGA9.....	30
2.8 DAS FUSIONSPROTEIN MLH1·ITGA9	32
<u>3 ZIELSETZUNG.....</u>	<u>35</u>
<u>4 ERGEBNISSE.....</u>	<u>37</u>
4.1 KLONIERUNGEN	37
4.1.1 PEXPR-IBA-MLH1·ITGA9, -MLH1Δ, -ΔITGA9, -ITGA9WT UND -MLH1WT.....	37

Inhaltsverzeichnis

4.1.2	PEXPR-IBA-MLH1·ITGA9.....	37
4.1.3	PEXPR-IBA-MLH1Δ	38
4.1.4	PEXPR-IBA-MLH1WT	38
4.1.5	PEXPR-IBA-ITGA9ΔMLH1	38
4.1.6	PEXPR-IBA- ITGA9WT.....	39
4.1.7	PCDNA-MLH1·ITGA9_EGFP	39
4.1.8	PCDNA-MLH1ΔITGA9_EGFP	39
4.1.9	PCDNA-MLH1WT_EGFP.....	39
4.1.10	PCDNA-BRCA1-N-FLAG UND PCDNA-BRCA1-C-FLAG.....	39
4.1.11	PDSRED_BRCA1 (FULLLENGTH)	40
4.1.12	PTRE2PURO_MLH1·ITGA9, PTRE2PURO_MLH1ΔITGA9 UND PTRE2PURO_ITGA9ΔMLH1 ..	41
4.2	AUFREINIGUNG VON MLH1·ITGA9 ÜBER STREPTACTIN-SÄULE UND -SEPHAROSE	42
4.3	ANALYSE DES PROTEINKOMPLEXES MITTELS NANOLC-MS/MS	44
4.4	LOKALISATION VON MLH1·ITGA9	47
4.5	CO-IMMUNOPRÄZIPITATIONEN.....	54
4.6	IMMUNOHISTOCHEMISCHE ANALYSE DER INTERAKTION MIT BRCA1	59
4.7	EINFLUSS AUF DNA-REPARATUR-SIGNALWEGE	61
4.8	APOPTOSEASSAY	67
4.9	FOCUS FORMATION ASSAY.....	69
4.10	ZELLADHÄSIONSASSAY	72
4.11	ZELLMIGRATIONSSASSAY	74
5	<u>DISKUSSION</u>	<u>77</u>
5.1	ENTSTEHUNG DES FUSIONSPROTEINS	77
5.2	IDENTIFIZIERUNG VON MLH1·ITGA9-INTERAKTIONSPARTNERN	79
5.3	DIE INTERAKTION VON MLH1·ITGA9 MIT BRCA1	80
5.4	KONSEQUENZEN DER INTERAKTION VON MLH1·ITGA9 UND MLH1Δ MIT BRCA1	81
6	<u>MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>88</u>
6.1	MATERIAL	88
6.1.1	CHEMIKALIEN	88
6.1.2	PUFFER.....	91
6.1.3	ENZYME	94

Inhaltsverzeichnis

6.1.4	ANTIKÖRPER	95
6.1.5	PLASMIDE UND VEKTOREN.....	99
6.1.6	CDNA-KLONE.....	101
6.1.7	SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE.....	101
6.1.8	DNA-LÄNGENSTANDARDS UND PROTEIN-MOLEKULARGEWICHTSMARKER.....	106
6.1.9	ORGANISMEN.....	107
6.1.10	NÄHRMEDIEN.....	109
6.1.11	KITS UND GEBRAUCHSFERTIGES MATERIAL.....	110
6.1.12	VERWENDETE DATENBANKEN	111
6.1.13	GERÄTE UND ZUBEHÖR	112
6.2	METHODEN	114
6.2.1	STANDARDMETHODEN DER MOLEKULARBIOLOGIE.....	114
6.2.2	DNA-SEQUENZIERUNG UND SEQUENZANALYSE	115
6.2.3	DNA-AMPLIFIKATION MITTELS POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR).....	115
6.2.4	STANDARDMETHODEN DER ZELLBIOLOGIE.....	117
6.2.5	STANDARDMETHODEN DER PROTEINBIOCHEMIE	118
6.2.6	MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE DER PROTEINE.....	122
6.2.7	SPEZIELLE METHODEN IN DIESER DOKTORARBEIT	123
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	136
8	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>	149
9	<u>ANHANG.....</u>	153
9.1	ERGEBNIS-LISTEN DER NLC-MALDI-MS/MS-LÄUFE	153
9.2	LEBENS LAUF.....	165
9.3	PUBLIKATIONEN, VORTRÄGE UND PRÄSENTATIONEN.....	167
9.4	DANKSAGUNG.....	168

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 2-1: EINTEILUNG DER KOLOREKTALKARZINOME NACH GENETISCHEN KRITERIEN	4
ABBILDUNG 2-2: KOLOREKTALE KARZINOGENESE NACH FEARON UND VOGELSTEIN	5
ABBILDUNG 2-3: SCHEMATISCHE KLASSIFIZIERUNG VON KOLOREKTALKARZINOMEN.	10
ABBILDUNG 2-4: ÜBERBLICK ÜBER DAS DNA-MISMATCH REPARATURSYSTEM IN EUKARYONTEN.	20
ABBILDUNG 2-5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES MLH1-PROTEINS	21
ABBILDUNG 2-6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES BRCA1-PROTEINS	25
ABBILDUNG 2-7: INTEGRINREZEPTOREN IM ÜBERBLICK.	28
ABBILDUNG 2-8: <i>INSIDE-OUT</i> - UND <i>OUTSIDE-IN</i> -SIGNALWEGE VON INTEGRINEN.	30
ABBILDUNG 2-9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES ITGA9-PROTEINS.	31
ABBILDUNG 2-10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER INTERSTITIELLEN DELETION.....	33
ABBILDUNG 2-11: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES FUSIONSPROTEINS MLH1·ITGA9.	34
ABBILDUNG 4-1: TESTVERDAU PEXPR-IBA-MLH1·ITGA9	38
ABBILDUNG 4-2: TESTVERDAU PCDNA_BRCA1-N UND -C	40
ABBILDUNG 4-3: TESTVERDAU PDSRED-BRCA1	41
ABBILDUNG 4-4: TESTVERDAU PTRE2PURO-KONSTRUKTE.	41
ABBILDUNG 4-5: ÜBER <i>STREP</i> -TACTIN AUFGEREINIGTE KONSTRUKTE.	43
ABBILDUNG 4-6: ÜBERPRÜFUNG DER EXPRESSION VON MLH1·ITGA9.....	44
ABBILDUNG 4-7: KOLLOIDAL-COOMASSIE GEFÄRBTES SDS	44
ABBILDUNG 4-8: WESTERN BLOT VON DER SÄULCHENAUFREINIGUNG IBA105-MLH1·ITGA9.....	45
ABBILDUNG 4-9: WESTERN BLOT DER ELUTIONSFRAKTIONEN (BS ³ UND DTBP).	46
ABBILDUNG 4-10: LOKALISATION VON MLH1·ITGA9::EGFP IN HEK293T-ZELLEN.....	47
ABBILDUNG 4-11: IHC VON MLH1·ITGA9::EGFP IN HEK293T-ZELLEN.	48
ABBILDUNG 4-12: URCHFLUSSZYTOMETRISCHE LOKALISATIONSANALYSE (SCHEMA).....	50
ABBILDUNG 4-13: DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE LOKALISATIONSANALYSE.....	51
ABBILDUNG 4-14: CLSM-VISUALISIERTE HEK293T MIT MLH1·ITGA9	52
ABBILDUNG 4-15: ZEITLICH AUFGELÖSTE AUFNAHME EINER SICH SPREITENDEN ZELLE	53
ABBILDUNG 4-16: REVERSE TRANSKRIPTASE-PCR VON INTERAKTIONSPARTNERN VON MLH1·ITGA9 ...	55
ABBILDUNG 4-17: CO-IMMUNPRÄZIPITATIONSEXPERIMENTE I.....	57
ABBILDUNG 4-18: CO-IMMUNPRÄZIPITATIONSEXPERIMENTE II (BRCA1-C UND N)	58
ABBILDUNG 4-19: CO-IMMUNPRÄZIPITATIONSEXPERIMENTE III (BRCA1 FULLLENGTH).....	59
ABBILDUNG 4-20: IHC LOKALISATIONSANALYSE VON ENDOGEMEM BRCA1	61

Tabellenverzeichnis

ABBILDUNG 4-21: DNA-REPARATUR-SIGNALWEGE..	62
ABBILDUNG 4-22: REVERSE TRANSKRIPTASE-PCR.....	63
ABBILDUNG 4-23: RELATIVE EXPRESSION UNTERSCHIEDLICHER GENE NACH ETOPOSIDBEHANDLUNG I....	63
ABBILDUNG 4-24: RELATIVE EXPRESSION UNTERSCHIEDLICHER GENE NACH ETOPOSIDBEHANDLUNG II...64	64
ABBILDUNG 4-25: WESTERN BLOT-ANALYSE VON P53 UND P-P53 (SERIN 15)	64
ABBILDUNG 4-26: RELATIVE FLUORESCENZINTENSITÄTEN I.....	65
ABBILDUNG 4-27: RELATIVE FLUORESCENZINTENSITÄTEN II	66
ABBILDUNG 4-28: PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS	66
ABBILDUNG 4-29: APOPTOSEASSAY.....	68
ABBILDUNG 4-30: FOCUS FORMATION ASSAY I.....	70
ABBILDUNG 4-31: FOCUS FORMATION ASSAY II.....	71
ABBILDUNG 4-32: ZELLADHÄSIONASSAY.....	73
ABBILDUNG 4-33: ZELLMIGRATIONASSAY	76
ABBILDUNG 5-1: VEREINFACHTER SIGNALWEG	82
ABBILDUNG 6-1: PRINZIP EINES KONFOKALEN LASER SCANNING-MIKROSKOPS.	132
ABBILDUNG 6-2: 96-WELL-PLATTE MIT ANGEFÄRBTEN ZELLAGGREGATEN.....	133

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: GENE MIT KODIERENDEN MIKROSATELLITEN.	8
TABELLE 2: AMSTERDAM-KRITERIEN I UND II.....	14
TABELLE 3: BETHESDA-KRITERIEN.....	15
TABELLE 4: INTERAKTIONSPARTNER VON MLH1.....	22

1 Zusammenfassung

Mit einer Prävalenz von rund 5% bildet das Hereditäre Nonpolypöse Kolorektalkarzinom (HNPCC), auch Lynch Syndrom genannt, die häufigste genetische Disposition unter allen Kolorektalkarzinomen in Deutschland. Das Lynch Syndrom wird autosomal-dominant vererbt und tritt im Schnitt bereits ab dem 44. Lebensalter auf, während die Mehrheit der Kolorektalkarzinome erst mit 63 Jahren diagnostiziert wird. Ein wichtiges Merkmal sind sogenannte HNPCC-assoziierte Malignome, welche sich außerhalb des Dickdarms befinden. Die Diagnose gestaltet sich allerdings relativ schwierig, da bei Lynch Syndrom-Patienten kein eindeutiger klinisch auffälliger Phänotyp vorliegt und die Diagnosestellung nur in Zusammenhang mit einer Familienanamnese des Patienten möglich ist.

Mittlerweile ist bekannt, dass für das charakteristische Auftreten von hochgradigen Mikrosatelliteninstabilitäten im Tumorgewebe ein defektes DNA-Mismatch-Reparatursystem verantwortlich ist. Diese Defekte treten vor allem in den Genen *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* oder *PMS2* auf und können über die Keimbahn vererbt werden.

Das Fusionsprotein *MLH1-ITGA9* wurde im Jahr 2009 publiziert, nachdem es bei einer Familie aus Französisch-Guyana gehäuft identifiziert wurde. Mehrere Familienmitglieder waren an unterschiedlichen Krebsarten erkrankt, und die Tatsache, dass neben Dickdarmtumoren auch synchrones und metachrones extrakolonisches Tumorwachstum auftrat, ließen den Schluss einer positiven Familienanamnese für das Lynch Syndrom zu. Auffällig war jedoch, dass das Spektrum dieser extrakolonischen Tumoren nicht im Einklang mit den typischen HNPCC-assoziierten Malignomen stand. Daher lag die Vermutung nahe, dass das Fusionsprotein *MLH1-ITGA9* für diesen Phänotyp verantwortlich ist.

Das dem zugrundeliegende Fusionsgen *MLH1-ITGA9* ist das Resultat einer interstitiellen Deletion auf Chromosom 3p21.3. Es kodiert für den N-Terminus des Mismatch-Reparaturgens *MLH1* sowie den C-Terminus des rund 400 kb *downstream* gelegenen Integrin $\alpha 9$. Aufgrund der fehlenden nukleären Lokalisationssequenz und weiterer wichtiger im C-Terminus gelegenen Domänen des *MLH1*-Proteins ist davon auszugehen, dass es außer Stande ist, Basenfehlpaarungen zu reparieren; ebenso sollte das Fusionsprotein theoretisch keine Funktionen des Wildtyp Integrin $\alpha 9$ mehr ausüben können.

Diese Annahmen konnten durch diverse Versuche wie Zelladhäsions- und Zellmigrationsassays bestätigt werden; das Fusionsprotein hatte dabei keinerlei Einfluß auf das Adhäsions- oder Migrationsverhalten unterschiedlicher Zelllinien.

Bezüglich der Lokalisation von MLH1-ITGA9 wurde über Fluoreszenzmikroskopie aufgrund der fehlenden nuklären Lokalisationssequenz im MLH1-Proteinteil der Nachweis erbracht, dass sowohl das Fusionsprotein als auch seine Variante MLH1 Δ (bestehend aus dem MLH1-Teil) lediglich im Zytoplasma, und nicht wie der Wildtyp auch im Zellkern, zu finden ist.

Desweiteren zeigten Co-Immunopräzipitationsexperimente eine Interaktion zwischen dem Fusionsprotein und MLH1 Δ mit dem Tumorsuppressor BRCA1. Die Folgen dieser Interaktion wurden auf translationeller und Proteinebene mit dem Ergebnis untersucht, dass Zellen, welche das Fusionsprotein oder seine trunkierte Variante MLH1 Δ exprimieren, nach Etoposidstimulierung teilweise in gravierendem Ausmaß einen negativen Einfluss auf die p53-abhängige DNA-Reparaturmaschinerie aufweisen. Dies zeigte sich besonders deutlich auf transkriptioneller Ebene in einer bis zu 96%igen Herunterregulierung wichtiger Zellzyklus- sowie proapoptotischer Gene. Die durchflusszytometrische Analyse dieser Zellen zeigte außerdem eine höhere Apoptoseresistenz nach Etoposidstimulierung im Vergleich zu Wildtyp-MLH1 exprimierenden Zellen.

Die immunohistochemische Analyse dieser Interaktion deutete auf eine nukleäre Exklusion des *shuttle*-Proteins BRCA1 hin, verursacht durch die Bindung an das zytoplasmatische Fusionsprotein MLH1-ITGA9 oder dessen Variante MLH1 Δ . Diese Interaktion mit der darauffolgenden nukleären Exklusion des BRCA1-Proteins könnte eine plausible Erklärung für die in den funktionellen Experimenten beobachteten Resultate liefern und weist auf einen neuartigen Pathomechanismus hin, der auch auf andere Genvarianten des MLH1-Gens übertragbar wäre, denen die nukleäre Lokalisationssequenz fehlt sowie über 3'-Deletionen oder Fusionen der C-Terminus abhanden gekommen ist.

2 Einleitung

2.1 Kolorektale Tumoren

2.1.1 Epidemiologie

Innerhalb der Europäischen Gemeinschaft werden jährlich rund 400.000 neu erkrankte Dickdarmkrebspatienten sowie circa 220.000 Todesfälle registriert. Das Statistische Bundesamt hat in Deutschland im Jahr 2009 über 26.000 Todesfälle durch bösartige Neubildungen des Dickdarms gezählt (Statistisches Bundesamt 2009). Die weltweite Inzidenz wird auf eine Million pro Jahr geschätzt. Während in Deutschland im Jahre 2006 rund 33.000 Neuerkrankungen bei Männern auftraten, hatte die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. sogar knapp 40.000 neu diagnostizierte Fälle für das Jahr 2010 vorausgesagt. In Deutschland beträgt die Inzidenz 30 (Frauen) bis 35 (Männer) pro 100.000 Einwohner und zählt mit 16% zu den zweithäufigsten bösartigen Erkrankungen nach Lungenkrebs sowie mit 12-14% zu der zweithäufigsten Krebstodesursache in Deutschland. Während zwischen 1980 und 2006 die altersstandardisierte Inzidenz an Darmkrebs zugenommen hat, war im selben Zeitraum eine Abnahme der Sterberaten zu beobachten. Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten lagen in den 1980er Jahren noch bei 50%; heutzutage rechnet man mit Raten von bis zu 63%. Das Lebenszeitrisiko beträgt für Männer 7,7% und für Frauen 6,5%. Während vor dem 40. Lebensjahr das Auftreten von Kolonkarzinomen eher selten ist, steigt zwischen dem 45. und dem 85. Lebensjahr sein Vorkommen exponentiell an. (Krebs in Deutschland 2005/2006, Häufigkeiten und Trends, 7. überarbeitete Auflage, Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2010, Van Lier M. *et al.*, 2009). Die Europäische Union hat auf die hohe weltweite Inzidenz reagiert indem sie Anfang 2011 die neuen EU-Leitlinien für Qualitätssicherung in der Darmkrebsvorsorge und –erkennung herausgegeben hat.

2.1.2 Einteilung der Kolorektalkarzinome

Kolorektale Karzinome lassen sich nach ihrer Genetik oder der Lokalisation einteilen (s. Abb. 2-1). Die Einteilung nach der Lokalisation des Tumors ist vor allem für die Prognose von Bedeutung. Um Aussagen über eine mögliche lymphogene bzw. hämatogene Metastasierung treffen zu können, wird ausgehend von der Anokutanlinie¹ die Lage des Tumors bestimmt. Ein Befall der benachbarten Lymphknoten (paraaortal, lateral oder inguinal) sowie das bevorzugte abführende Blutsystem (Pfortader oder *V. cava*) lassen schließlich Schlüsse auf weitere metastasierte Organe zu (Renz-Polster H., 2011).

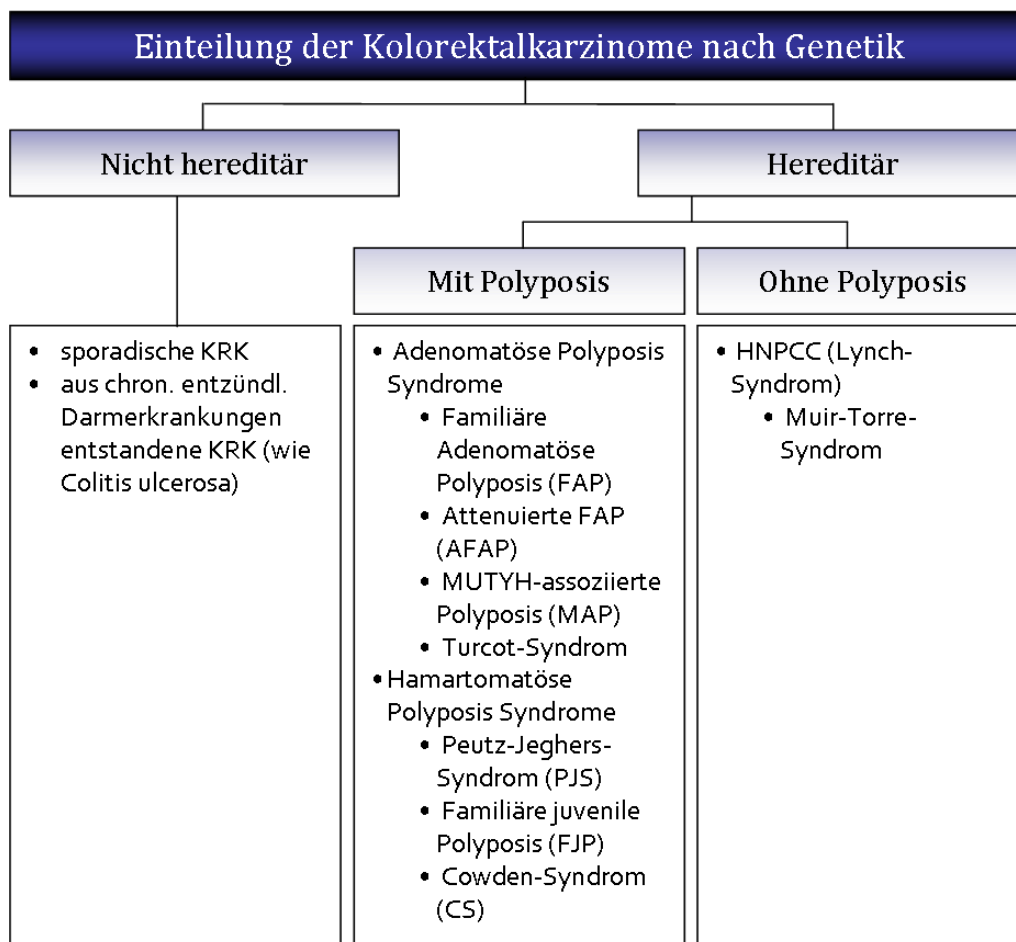


Abbildung 2-1: Einteilung der Kolorektalkarzinome nach genetischen Kriterien

¹ äußere Begrenzung des Analkanals

Für die Diagnostik, Therapie sowie Vor- und Nachsorge spielt allerdings die Einteilung nach dem genetischen Hintergrund die größere Rolle. Während die meisten Tumore sporadischer Natur sind, besitzen 5-15% genetische Ursachen (Lynch H. *et al.*, 2003).

2.1.3 Kolorektale Tumorgenese

Nicht-hereditäre Karzinome entstehen entweder aus chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen in Folge der sich ständig umbauenden entzündeten Schleimhaut oder wie in den meisten Fällen (zu 60%) über eine Adenom-Karzinom-Sequenz. Diese Sequenz beschreibt die schrittweise Entwicklung von normalem über dysplastischem Epithelgewebe bis schließlich zum Karzinom, ausgelöst durch das Zusammenspiel veränderter Onkogene und Tumorsuppressorgene.

2.1.3.1 Klassische Adenom-Karzinom-Sequenz und Chromosomale Instabilität (CIN)

Die klassische Adenom-Karzinom-Sequenz wurde erstmals 1989 von Fearon und Vogelstein beschrieben und wird auch als Suppressor-Signalweg bezeichnet. Die auf diesem Weg entstehenden Tumoren besitzen ein hohes Maß an chromosomaler Instabilität (CIN).

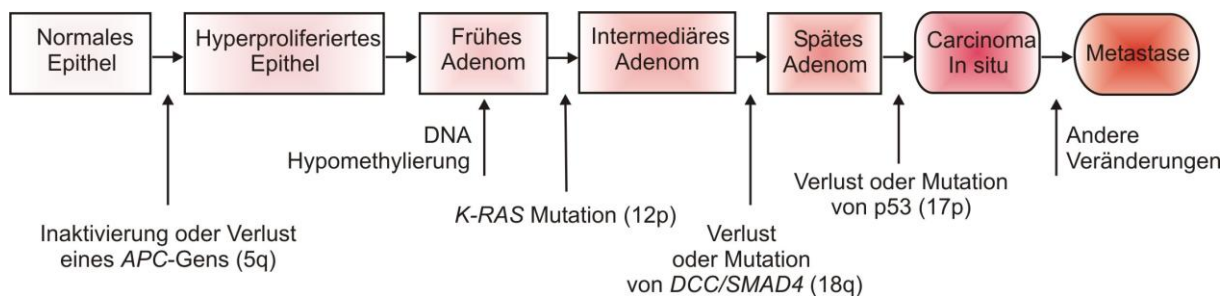


Abbildung 2-2: Kolorektale Karzinogenese nach Fearon und Vogelstein

Diesem Modell zufolge ist die Kolorektalkarzinogenese vor allem durch vier Merkmale gekennzeichnet: 1.) Kolorektale Tumoren entstehen in Folge von aktivierten Onkogenen und inaktivierten Tumorsuppressorgenen. 2.) Es sind mindestens 5 mutierte Gene nötig, um

einen bösartigen Tumor zu erzeugen; sind weniger Gene betroffen, ist die Entstehung von gutartigen Tumoren möglich. 3.) Auch wenn die genetischen Veränderungen oft einer bestimmten bevorzugten Reihenfolge unterliegen, ist weniger die zeitliche Abfolge als eher die Akkumulation der Mutationen verantwortlich für die Eigenschaften des jeweiligen Tumors. Und 4.) In einigen Fällen sind mutierte Tumorsuppressorgene in der Lage, selbst in heterozygotem Zustand einen phänotypischen Effekt hervorzurufen (Fearon ER., Vogelstein B.; 1990).

Die chromosomale Instabilität ist der häufigste Typus genomischer Instabilität und findet sich in 80-85% aller sporadischen Kolonkarzinome. Unter den gängigsten Formen der CIN sind 1) Sequenzveränderungen wie Basensubstitutionen, -insertionen, -deletionen oder Mikrosatelliteninstabilitäten, 2) Aneuploidie, 3) Chromosomen-Rearrangements sowie 4) Genamplifikationen. Bei der Suche nach den verantwortlichen Mechanismen waren vor allem solche Gene dereguliert, welche spezifische Funktionen bei der Zellzykluskontrolle einnehmen. Die am besten untersuchten Gene welchen eine ursächliche Rolle bei der CIN zugesprochen wird sind die Gene *mad* und *bub*, welche die Spindel-Kinetochor-Interaktion während der Mitose regulieren (Grady *et al.*, 2008). Proteine von Mad (*Mitotic arrest deficient*) und Bub (*Budding uninhibited by benomyl*) werden bei Defekten des Mikrotubuliapparates aktiviert, inhibieren die Cdc20-Untereinheit der Ligase *Anaphase promoting complex* (APC) und unterbinden damit den Metaphase-Anaphase-Übergang (Vermeulen *et al.*, 2003).

Als eine der Ursachen für Aneuploidie werden abnormale Centrosomen-Anzahl und –Funktionen gesehen. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Überexpression von *STK15/BTAK/ARK1/aurora2*, einer centrosomen-assoziierten Serin-Threonin-Kinase, einen gestörten Aufbau des Spindelapparates und damit eine CIN zur Folge hat (Glover *et al.*, 1995; Sen *et al.*, 1997).

Genomische Stabilität wird aber nicht nur durch verschiedene Kontrollpunkte während des Zellzyklusses gewährleistet, welche die Mitose, Centrosomenfunktionen oder die Schwesterchromatid-trennung überwachen, sondern auch über Mechanismen, welche im Falle von genotoxischem Stress für die Erhaltung der intakten DNS sorgen. Die dafür verantwortlichen Proteine erfüllen dabei unterschiedliche Funktionen; sie können DNS-Schäden erkennen, Signale an andere Proteine weiterleiten oder selber Effektorproteine darstellen, welche einen Zellzyklusarrest oder die DNS-Reparatur einleiten.

Zahlreiche dieser Proteine wurden in Hefen identifiziert, darunter auch *TP53*, *ATM*, *ATR*, *BRCA1* und *BRCA2* sowie *hRAD17* welche bereits in Verbindung mit humanen Krebsformen gebracht wurden (Bao *et al.* 1999). *ATM* und *ATR* beispielsweise phosphorylieren diverse Schlüsseffektorproteine wie *CHK2* oder *CHK1* nach Auftreten von DNA-Schäden und initiieren in der S- sowie intra-S-Phase eine Verlangsamung oder Arretierung des Zellzyklus. Mutationen oder Amplifikationen dieser und anderer Gene konnten experimentell eine CIN bewirken (Rotman *et al.*, 1998; Smith L., 1998). Zu den weiteren Mechanismen, die zu einer CIN führen können, zählen Defekte bei der Basenexcisionsreparatur (*MYH*, (Cardoso *et al.*, 2006), mutierte Zellzyklusproteine (*CDC4*, (Rajagopalan *et al.*, 2004), Telomerendysfunktion (*TERC*, (Maser *et al.*, 2002)) sowie eine Überexpression von C-MYC (Felsher *et al.*, 1999).

2.1.3.2 Mutator-Signalweg und Mikrosatelliteninstabilität

Neben diesem traditionellen Modell von Fearon und Vogelstein existiert ein zweites Modell, welches Mutator-Signalweg oder MSI-Signalweg (MSI für Mikrosatelliteninstabilität) genannt wird. Er ist für 15-20 % aller sporadischen Kolonkarzinome verantwortlich (Moran A. *et al.*, 2010). Diese Tumoren beherbergen eine bis zu 1000-fach höhere Mutationsrate in Mikrosatellitenmarkern im Vergleich zu normalen Zellen und sind daher durch eine hohe Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) gekennzeichnet. Mikrosatelliten sind repetitive, phylogenetisch konservierte Di-, Tri- oder Tetranukleotidsequenzen, die über das gesamte Genom verteilt vorkommen. Eine Akkumulation von Mutationen in diesen Sequenzen wird durch einen Defekt in mindestens einem der Mismatch-Reparaturgene verursacht.

Die Hauptaufgabe dieses Reparatursystems besteht darin, Fehler, die während der Replikation von DNA entstehen, zu erkennen, die falschen Basen wieder auszutauschen sowie DNA neu zu synthetisieren.

Eine Inaktivierung eines dieser Gene führt schließlich zur Akkumulation von Leserasterverschiebungen in kodierende Regionen von Genen (kodierende Mikrosatelliten); interessanterweise nicht nur in solchen, die in der Regel vom Suppressor-Signalweg betroffen sind, wie *p53*, *APC* oder *K-ras*, sondern auch in Genen, die beispielsweise an der

Apoptose beteiligt sind (BAX, BCL-10, Caspase-5, FAS, RIZ, APAP-1), Mismatch-Reparaturgenen (MLH3, MSH3, MSH6) sowie Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren (TGFβRII, IGF2R, WISP-3) (siehe Tabelle 1, (Duval A. 2002).

Tabelle 1: Gene mit kodierenden Mikrosatelliten.

Aus Duval et.al 2002.

Gen	Funktion	Wiederholungseinheit
ACTRII	Wachstums- Differenzierungsfaktor- Rezeptor	u. (A) 8
AIM2	Interferon-induzierbares Protein	(A) 10
AXIN-2	Wnt-Signalweg	(A) 6*2, (G) 7, (C) 6
BAX	Proapoptotischer Faktor	(G) 8
BCL-10	Proapoptotischer Faktor	(A) 8
BLM	Erkennung von DNA-Schäden	(A) 9
Caspase-5	Propapptotischer Faktor	(A) 10
CDX2	Homöobox- Transkriptionsfaktor	(G) 7
CHEK1	Reaktion auf DNA-Schäden	(A) 9
FAS	Proapoptotischer Faktor	(T) 7
GRB-14	Wachstumsfaktor-assoziiertes Adapterprotein	(A) 9
hG4-1	Zellzyklus	(A) 8
IGFIIR	Wachstumsfaktorrezeptor	(G) 8
MBD-4	DNA-Glykosylase und Methyl- CpG bindendes Protein	(A) 10
MLH3	Mismatch-Reparaturgen	(A) 9
MSH3	Mismatch-Reparaturgen	(A) 8
MSH6	Mismatch-Reparaturgen	(C) 8
NADH-UOB	NADH Ubichinon- Oxidoreduktase	(T) 9
PTEN	Zellzyklus	(A) 6*2

Einleitung

RAD-50	Antwort auf DNA-Schäden	(A) 9
RHAMM	Cellmotilität	(A) 9
RIZ	Zellzyklus Apoptoseprotein	und (A) 8, (A) 9
SEC63	ER Membranprotein	(A) 10, (A) 9
TCF-4	Transkriptionsfaktor Signalweg)	(Wnt- (A) 9
TGFβRII	Wachstumsfaktorrezeptor	(A) 10
WISP-3	Wachstumsfaktor Signalweg)	(Wnt- (A) 9

Empfehlungen des National Cancer Institute (NCI) zufolge wird eine MSI durch die Analyse von 5 Mikrosatellitenmarkern festgestellt: drei Dinukleotidmarkern (D2S123 auf Chromosom 2p16, D5S346 auf Chromosom 5q21-5q22 und D17S250 auf Chromosom 17q12) und zwei Mononukleotidmarkern (BAT25 auf Chromosom 4q12 und BAT26 auf Chromosom 2p21). Finden sich dabei in über 30% der Markern eine MSI, wird der Tumor als hochgradige MSI (MSI-H) klassifiziert, bei weniger als 30% liegt eine niedriggradige MSI vor, und bei Abwesenheit jeglicher MSI wird der Tumor als mikrosatellitenstabil eingestuft (Boland C. *et al.*, 1998). Der Mikrosatellitenstatus eines Tumors ist nicht nur aufgrund seiner genotypischen (MSI-H-Tumoren in der Regel diploid, seltener Verlust der Heterozygotie) oder phänotypischen (MSI-H-Tumoren entstehen häufiger im proximalen Kolon mit muzinöser Differenzierung, häufiger bei Frauen, tiefere Tumorerinvasion (Raut C. *et al.*, 2004) Merkmale von Interesse.

Als prädiktiver und prognostischer Marker hat er in den letzten Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung gewonnen. In Bezug auf ein vorhergesagtes Ansprechen auf Standardtherapien erwies sich die Erhebung des MSI-Status jedoch als umstritten; so hat Guastadisegni 2010 in einer Metaanalyse bestehend aus 55 Studien zeigen können, dass die Analyse eines einzigen Tumormarkers wie der MSI nicht ausreicht, um den Therapieerfolg einer 5-Fluorouracil-Behandlung vorhersagen zu können (Guastadisegni C. *et al.*, 2010). Als unbestritten gilt mittlerweile allerdings ein Zusammenhang zwischen MSI-Status, Lymphozyteninfiltration und einer höheren Überlebensrate.

Mehrere Studien konnten zeigen, dass die Anwesenheit tumorinfiltrierender Lymphozyten signifikant mit einer höheren Überlebensrate korreliert (Galon J, *et al.* 2006), vermutlich zurückzuführen auf ein Ansprechen des eigenen Immunsystems mit CD8-positiven T-Zellen auf sogenannte Neopeptide, die lediglich in den Tumoren, nicht aber in normalem Gewebe, aufgrund des fehlenden Mismatch-Reparatursystems entstanden sind (Drescher K. *et al.*, 2010).

Auch in sporadischen Kolorektalkarzinomen treten hochgradige mikrosatelliteninstabile Tumoren auf; sie entstehen allerdings hauptsächlich durch epigenetische Hypermethylierung des hMLH1-Gens (sogenannter CpG-Insel-Methylator-Phenotyp) oder Mutationen des BRAF-Gens (Deng G. *et al.*, 2004).

Zusammengefasst zeigen von allen Kolorektalkarzinomen 15-20% eine sogenannte Mikrosatelliteninstabilität oder eine abnormale Immunohistochemie; diese Tumoren entstehen auf dem Mutator-Signalweg. Die restlichen 80-85% sind mikrosatellitenstabil und entstehen meist über eine Chromosomale Instabilität. Sporadische Tumoren resultieren aus einer somatischen Inaktivierung des hMLH1-Gens über Promotorhypermethylierung und solche Tumoren, welche über Keimbahnmutation entstanden sind und in den meisten Fällen eine Mikrosatelliteninstabilität aufweisen, werden als HNPCC (für engl. „Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer“) oder Lynch-Syndrom-Tumoren bezeichnet (de la Chapelle A, Hampel H. 2010).

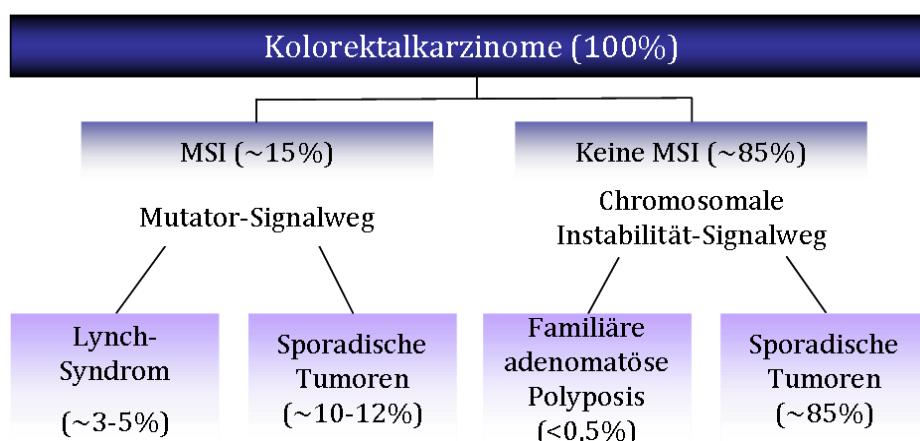


Abbildung 2-3: Schematische Klassifizierung von Kolorektalkarzinomen. Nach de la Chapelle 2010.

MSI = Mikrosatelliteninstabilität

2.2 HNPCC / Lynch Syndrom

2.2.1 Epidemiologie

Das hereditäre kolorektale Karzinom ohne Polyposis (HNPCC) stellt mit einer Prävalenz von 3-5% aller kolorektalen Karzinome die häufigste Disposition dar (Schulmann K. *et al*, 2004). Im Vergleich zu sporadischen Kolorektalkarzinomen werden HNPCC bereits in jüngeren Patienten diagnostiziert (im Schnitt 44 Jahre) und für Anlageträger besteht ein 80 prozentiges Risiko, mit 65 Jahren an dieser Krebsform zu erkranken. Auch die Wahrscheinlichkeit, erneut an Dickdarmkrebs oder an anderen Organen Karzinome zu entwickeln, ist bei HNPCC-Patienten erhöht, wobei Frauen zu 50-60% an Gebärmutter-schleimhautkrebs erkranken können (Geary J. *et al*, 2008).

2.2.2 Geschichte

Das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinom wurde erstmals im Jahr 1913 erwähnt, als Aldred Scott Warthin eine Abhandlung über die Vererbung von Karzinomen (Warthin, 1913) veröffentlichte. Seine Forschung wurde damals angetrieben vom Fatalismus seiner Näherin, die ihren Tod in jungen Jahren durch entweder ein Kolonkarzinom oder einen Krebs der weiblichen Geschlechtsorgane vorausgesehen haben wollte, da über Generationen hinweg ihre Angehörigen bereits daran gestorben seien. Warthin beschäftigte sich daraufhin eingehend mit dem Stammbaum der jungen Frau und verfolgte ihn bis ins Jahr 1856 zurück.

Tatsächlich starb die Näherin in jungen Jahren an einem Endometriumkarzinom und sollte auch nicht das letzte an Krebs erkrankte Familienmitglied bleiben. Über Jahre hinweg berichtete Warthin regelmäßig über Neuerkrankungen der von nun an von ihm bezeichneten „Family G“, aber es dauerte über ein halbes Jahrhundert, bis ein anderer Forscher, Henry T. Lynch, sich mit den vererbaren Faktoren bei der Krebsentstehung beschäftigte (Lynch HT *et al*, 1966).

Lynch untersuchte derzeit den Stammbaum eines Patienten, dessen Familie überdurchschnittlich oft an kolorektalen Karzinomen ohne erkennbarer Polyposis erkrankte.

Bei seinen Recherchen stieß er schließlich auf Warthins „Family G“, und gemeinsam mit AJ Krush veröffentlichte er 1971 eine aktualisierte Familienanamnese basierend auf über 650 Familienmitgliedern. (Lynch HT, Krush AJ 1971) Die wesentlichen Charakteristika waren schon damals:

- verstärktes Auftreten von Adenokarzinomen, hauptsächlich des Kolon und des Endometrium
- erhöhtes Risiko für multiple Tumore
- autosomal dominante Vererbung
- früher Krankheitsbeginn

Seine Ergebnisse standen damit in krassem Gegensatz zur damaligen Auffassung, für die Entstehung von Krebs seien hauptsächlich Umweltfaktoren verantwortlich.

2.2.3 Charakteristika

Hereditäre kolorektale Karzinome ohne Polyposis werden autosomal-dominant vererbt und treten im Schnitt bereits ab dem 44. Lebensalter auf, während die Mehrheit der Kolorektalkarzinome erst mit 63 Jahren diagnostiziert wird. Dabei befinden sich die Karzinome überproportional häufig (70-85%) im rechtsseitigen Hemikolon. Gravierend ist die schnelle Tumorentwicklung: Lynch-Syndrom-Patienten können durchschnittlich innerhalb von nur 2-3 Jahren aus einem Adenom ein Karzinom entwickeln, während andere Kolonkarzinome bis zu 10 Jahren benötigen. Ein wichtiges Merkmal sind auch die durch die hohe Penetranz auftretenden sogenannten HNPCC-assoziierten Malignome, welche sich außerhalb des Dickdarms befinden (Lynch H. *et al.*, 2009).

Die häufigsten extrakolonischen Tumoren befinden sich in Magen, Dünndarm, den Harnwegen, Eierstöcken, dem Gehirn und der Bauchspeicheldrüse (Watson P. *et al.*, 2005); zwei Varianten des HNPCC sind das Muir-Torre-Syndrom, bei denen neben Kolon-, Endometrium oder Urothelkarzinomen auch multiple benigne und maligne Talgdrüsentumoren und Kerathokanthome der Haut auftreten können (Torre D., 1968) sowie das Turcot-Syndrom, welches sich klinisch durch das gemeinsame Auftreten von Hirntumoren und multiplen kolorektalen Adenomen oder Karzinomen auszeichnet (Turcot J *et al.*, 1959).

Seitdem man sich des gehäuften Auftretens extrakolonischer Tumoren und der molekularen Grundlagen der Pathogenese bewusst wurde, wird eine Klassifizierung in Lynch-Syndrom Typ I (nur Dickdarm betroffen) und Typ II (auch andere Organe betroffen) bevorzugt (*Online Mendelian Inheritance In Man*, Datenbank-Nr. 120435, 2011).

Auch das Auftreten von hochgradigen Mikrosatelliteninstabilitäten im Tumorgewebe ist charakteristisch für Lynch-Syndrom-Karzinome, welches schon bald nach Entdeckung der MSI im Jahre 1993 einem defekten DNA-Mismatch-Reparatur-System zugeschrieben werden konnte. Diese Defekte treten vor allem in den Genen MLH1, MSH2, MSH6 oder PMS2 auf und können über die Keimbahn vererbt werden.

2.2.4 Diagnose

Im Gegensatz zu anderen vererbbaaren polypös-adenomatösen Darmerkrankungen (familiäre adenomatöse Polyposis, Peutz-Jeghers-Syndrom, familiäre juvenile Polyposis) ist die Diagnose des Lynch-Syndrom durch die Tatsache erschwert, dass hier kein klinisch auffälliger Phänotyp vorliegt. Daher ist die Diagnosestellung nur in Zusammenhang mit der Familienanamnese des Patienten möglich.

Im Jahre 1990 traf erstmals in Amsterdam die "International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer" zusammen, um gemeinsam die wesentlichen Kernpunkte des HNPCC festzulegen. Daraus entstanden die für die klinische Diagnostik unentbehrlichen Amsterdam-Kriterien, welche 1998 nochmals überarbeitet wurden und auch extrakolonische Karzinome einschloss (Vasen H. *et al.*, 1999) (Tab.2).

Tabelle 2: Amsterdam-Kriterien I und II

Amsterdam-Kriterien I ^{(*)2}

- Mindestens drei Familienangehörige mit histologisch gesichertem kolorektalem Karzinom, davon einer mit den beiden anderen erstgradig verwandt; FAP muss ausgeschlossen sein.
 - Wenigstens zwei aufeinanderfolgende Generationen betroffen.
 - Bei mindestens einem Patienten Diagnosestellung vor dem 50. Lebensjahr.
-

Amsterdam-Kriterien II ^(*)

- Mindestens drei Familienangehörige mit histologisch gesichertem kolorektalem Karzinom oder einem Karzinom des Endometriums, Dünndarms oder Urothels (ableitende Harnwege/Nierenbecken), davon einer mit den beiden anderen erstgradig verwandt; FAP muss ausgeschlossen sein.
- Wenigstens zwei aufeinanderfolgende Generationen betroffen.
- Bei mindestens einem Patienten Diagnosestellung vor dem 50. Lebensjahr.

Zeitgleich erkannte man, dass die Amsterdam-Kriterien nicht ausreichten, um potentielle HNPCC-Patienten zu identifizieren. Da bis zu 90% aller HNPCC-Kolorektalkarzinome (KRK) eine Mikrosatelliteninstabilität aufweisen (Aaltonen LA *et al.*, 1994; Peltomäki P. *et al.*, 1997; Liu B *et al.* 1996), bot es sich an, auch solche Familienmitglieder auf ihren Mikrosatellitenstatus zu testen, welche nicht den Amsterdam-Kriterien entsprachen. Man einigte sich auf die sog. Bethesda-Kriterien (Tab. 3) die neben den bisher getesteten Faktoren auch die häufigsten phenotypischen Ausprägungen umfassten (Rodriguez-Bigas *et al.*, 1997).

Patienten, welche positiv auf eine Mikrosatelliteninstabilität getestet wurden, sollten sich demnach einer gentechnischen Analyse auf Mismatch Reparaturgen-Mutationen unterziehen, welches heutzutage über Immunohistochemie (IHC) geschieht. Im Jahr 2004 wurden auch diese Kriterien wieder überarbeitet und gelten heute in Kombination mit der Mikrosatellitenstabilitätsanalyse als der Goldstandard in der klinischen Diagnostik des Lynch-Syndroms (Umar A. *et al.*, 2004).

^{2 (*)} alle Kriterien müssen zutreffen

Tabelle 3: Bethesda-Kriterien

Klassische Bethesda Kriterien ^(*)

- Patienten, die die Amsterdam-Kriterien I/II erfüllen
- Patienten mit synchronen / metachronen Tumoren aus dem HNPCC-Spektrum
- Patienten mit kolorektalem Karzinom und Verwandte 1. Grades mit Karzinom aus dem HNPCC-Spektrum vor dem 45. Lebensjahr oder mit kolorektalem Adenom vor dem 45. Lebensjahr
- Patienten mit kolorektalem Karzinom oder Endometriumkarzinom vor dem 45. Lebensjahr
- Patienten mit rechtsseitigem, wenig differenziertem kolorektalem Karzinom vor dem 45. Lebensjahr
- Patienten mit kolorektalem Karzinom vom Siegelringzelltyp vor dem 45. Lebensjahr
- Patienten mit kolorektalem Adenom vor dem 45. Lebensjahr

Revidierte Bethesda-Kriterien ^(*)

- Kolorektales Karzinom, welches bei einem Patienten diagnostiziert wurde, der jünger als 50 Jahre ist
- Auftreten von synchronen oder metachronen kolorektalen oder anderen HNPCC-assoziierten Tumoren¹, unabhängig vom Alter
- Kolorektales Karzinom mit MSI-H² typischer Morphologie³, diagnostiziert bei einem Patienten jünger als 60 Jahre⁴
- Patient mit kolorektalem Karzinom und mindestens einem erstgradig Verwandten mit einem HNPCC-assoziierten Tumor¹, mit mindestens einem Tumor, der im Alter unter 50 Jahren diagnostiziert wurde
- Patient mit kolorektalem Karzinom und mindestens zwei erst- oder zweitgradig Verwandten mit HNPCC-assoziierten Tumoren¹, unabhängig vom Erkrankungsalter³

³ (*) Mindestens ein Kriterium sollte erfüllt sein

¹HNPCC-assoziierte Tumoren schließen Tumoren folgender Organe bzw. Gewebe ein: Kolorektrum, Endometrium, Magen, Ovar, Pankreas, Ureter und Nierenbecken, Gallengang, Gehirn (üblicherweise Glioblastome wie beim Turcot-Syndrom), Talgdrüsenadenome und Keratoakanthome (beim Muir-Torre-Syndrom und Dünndarm).

2.3 Das Mismatch-Reparatursystem

DNA-Schäden können im Laufe der Zeit über unterschiedliche Mechanismen in Zellen akkumulieren. Dies geschieht beispielsweise bei der Exposition gegenüber genotoxischen oder kanzerogenen Stoffen, aber auch endogener reaktiver Metabolite wie Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) oder Strahlenschäden (ionisierende oder UV). Andere Ursachen von DNA-Schäden sind Fehler, welche während des normalen DNA-Metabolismus oder abnormaler DNA-Prozessierung inklusive DNA-Replikation, Rekombination oder Reparatur auftreten können. Solche Schäden können – wenn sie nicht behoben werden – zu Mutationen in somatischen oder Keimbahnzellen und damit zu Veränderungen des zellulären Phänotypes führen. Um dies zu verhindern, existieren unterschiedliche Reparaturmechanismen wie die Basen- oder Nukleotid-Excisionsreparatur (BER und NER) oder auch das Mismatch-Reparatursystem, auch Fehlpaarungsreparatur genannt.

Die Hauptaufgabe des Mismatch-Reparatursystems besteht darin, Basen-Fehlpaarungen zu korrigieren, welche in Folge von Fehlern der DNA-Polymerase während der DNA-Synthese auftreten. Es leistet damit einen wichtigen Beitrag zur Sicherstellung der genomischen Stabilität oder leitet gegebenenfalls die ersten notwendigen Schritte zur Einleitung einer Apoptose ein (Da Silva F. *et al.*, 2009). Daneben spielen Mismatch-Reparaturproteine auch eine Rolle beim Zellzyklus, der meiotischen reziproken Rekombination und der meiotischen Fehlpaarungsreparatur (Santucci-Darmanin S. *et al.*, 2000; Storlazzi A. *et al.*, 2010).

Die ersten Studien an Mismatch-Reparaturgenen wurden in *Escherichia coli* durchgeführt; die hier für die Fehlpaarungsreparatur identifizierten Proteine sind *MutS*, *MutL*, *MutH*, *DNA Helikase II (MutU/UvrD)*, vier Exonukleasen (*Exo I*, *Exo VII*, *ExoX* und *RecJ*), *SSB (single stranded DNA binding protein)*, *DNA Polymerase III Holoenzym* und die DNA Ligase (Li, G. 2008).

²MSI-H = Tumore mit hoher Mikrosatelliteninstabilität: mindestens zwei der fünf Marker des vom National Cancer Institut empfohlenen Panels in instabil

³Auftreten einer intratumoralen lymphozytären Infiltration, „*Crohn's-like lesions*“, muzinöse / siegelringzellige Differenzierung oder medulläres Wachstumsmuster

⁴Es gab keine Übereinstimmung zwischen den Workshopteilnehmern, ob das Alterskriterium in die obige Richtlinie 3 aufgenommen werden soll; die Teilnehmer stimmten dafür, „jünger als 60 Jahre“ in dieser Richtlinie zu belassen.³

Der erste Schritt beginnt mit der Erkennung der Basenfehlpaarung durch das MutS-Homodimer, welches anschließend das MutL-Homodimer rekrutiert. Die ATP-abhängige Bildung dieses ternären Komplexes aktiviert die MthH-Endonuklease-Aktivität, nachdem dieses an den hemimethylierten, neu synthetisierten d(GATC)-Strang gebunden hat, und fügt einen Einzelstrangbruch ein. Die UvrD-Helikase entwindet die Enden des fehlerhaften Stranges und ermöglicht dadurch den Abbau durch unterschiedliche Exonukleasen bis zur Stelle der Fehlpaarung. Die entstandene Lücke wird durch die DNA Polymerase III aufgefüllt und schließlich durch die DNA-Ligase versiegelt.

In Eukaryonten ist das Mismatch-Reparatursystem etwas komplexer. Während in *E.coli* MutS und MutL Homodimere darstellen, bestehen die eukaryontischen Homologe aus Heterodimeren. hMSH₂ (*mutS homolog 2*) heterodimerisiert dabei mit hMSH6 (*mutS homolog 6*) oder hMSH3 (*mutS homolog 3*) und bildet MutS α bzw. MutS β . Für MutL existieren mindestens 4 Homologe; hMLH₁ (*mutL homolog 1*) heterodimerisiert mit hPMS₂ (*postmeiotic segregation increased 2*) zu hMutL α , mit hPMS₁ (*postmeiotic segregation increased 1*) zu hMutL β und mit hMLH₃ (*mutL homolog 3*) zu hMutL γ . hMutS α dient dabei der Erkennung kleinerer Insertions- und Deletionsschleifen (1-2 Basen) und bindet an die Basenfehlpaarung, während hMutS β in der Lage ist, größere Insertions- und Deletionsschleifen (2 – 12 Basen) zu detektieren (Kunkel T. *et al.*, 2005). hMutL α stellt die aktivste und wichtigste Komponente neben hMutS α dar und leitet die erforderlichen Reparaturmaßnahmen ein, nachdem hMutS α die Fehlpaarung identifiziert hat (Iyer R. *et al.*, 2006). Es besitzt Endonuklease-Aktivität (Kadyrov F. *et al.*, 2006), interagiert mit dem MutS-DNA-Komplex sowie anderen Enzymen, welche für die DNA-Synthese nötig sind und spielt eine Rolle bei der meiotischen Rekombination (Jiricny J. 2006). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass es in der Lage ist, seine heterodimeren Komplexpartner zu stabilisieren (Plotz, G. *et al.*, 2002)

Zusätzlich zu den MutS und MutL-Homologen existieren weitere Faktoren, von welchen die meisten eine Rolle bei der DNA-Replikation spielen. Dies sind vor allem PCNA (*proliferating cellular nuclear antigen*), RFC (*replication factor C*), RPA (*replication protein A*), Polymerase δ und die Exonuklease I (ExoI).

Das Auftreten von DNA-Schäden kann einerseits deren Reparatur, andererseits aber auch ein Zellzyklusarrest bzw. Apoptose zur Folge haben. Abhängig von der Schwere und der Art des DNA-Schädens entscheiden vor allem die Phosphatidylinositol-3-ähnlichen Proteinkinasen ATM (*ataxia-telangiectasia, mutated*) und ATR (*ATM and Rad3-related*) über das weitere Vorgehen in der Zelle. Geringe DNA-Schäden haben meist einen Zellzyklusarrest und die Reparatur zur Folge, während schwerwiegende Schäden zum Zelltod durch Apoptose führen. Die beiden Phosphatidylinositol-3-ähnlichen Proteinkinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ATM and Rad-3 related*) nehmen hierbei Schlüsselrollen ein. Nach Aktivierung folgt unter anderem die Phosphorylierung von Chk1 oder Chk2, was wiederum Reparatur, Zellzyklusarrest oder Apoptose einleitet. Es konnte gezeigt werden, dass für die Auslösung dieser Signalkaskaden eine direkte Interaktion verschiedener Mismatch-Reparaturproteine mit diesen Kinasen verantwortlich ist, wie sie für MSH2 beschrieben wurde (Wang, Y. *et al.*, 2003). 1999 zeigten Duckett *et al.*, dass für die Aktivierung von p53 durch Phosphorylierung an Serin 15 und 392 nach Behandlung mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) und N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff funktionelles MutS α und MutL α notwendig sind (Duckett D. *et al.*, 1999). Eine Abhängigkeit vom Mismatch-Reparatursystem zeigte sich auch für p73, welches bei Überexpression proapoptotische Eigenschaften hat und damit zu einem der wichtigsten Mediatoren der MMR-vermittelten Apoptose wurde (Gong J. *et al.*, 1999). 2008 erweiterten Li *et al.* die Gruppe der MMR-abhängigen DNA-Reparaturproteine um c-Abl und GADD45 α , wobei c-Abl/p73 α nach Aktivierung durch MLH1 Apoptose und Zellüberleben und c-Abl/GADD45 α zusätzlich noch G2-Arrest vermitteln können (Li L. *et al.*, 2008). Diese Erkenntnis stimmt mit den Ergebnissen von Kim *et al.* überein, welche MLH1 gemeinsam in einem Komplex mit c-Abl und der MAP-Kinase MEKK1 fanden, der in der Lage war, über Aktivierung von c-Jun Apoptose auszulösen (Kim W. *et al.*, 2007).

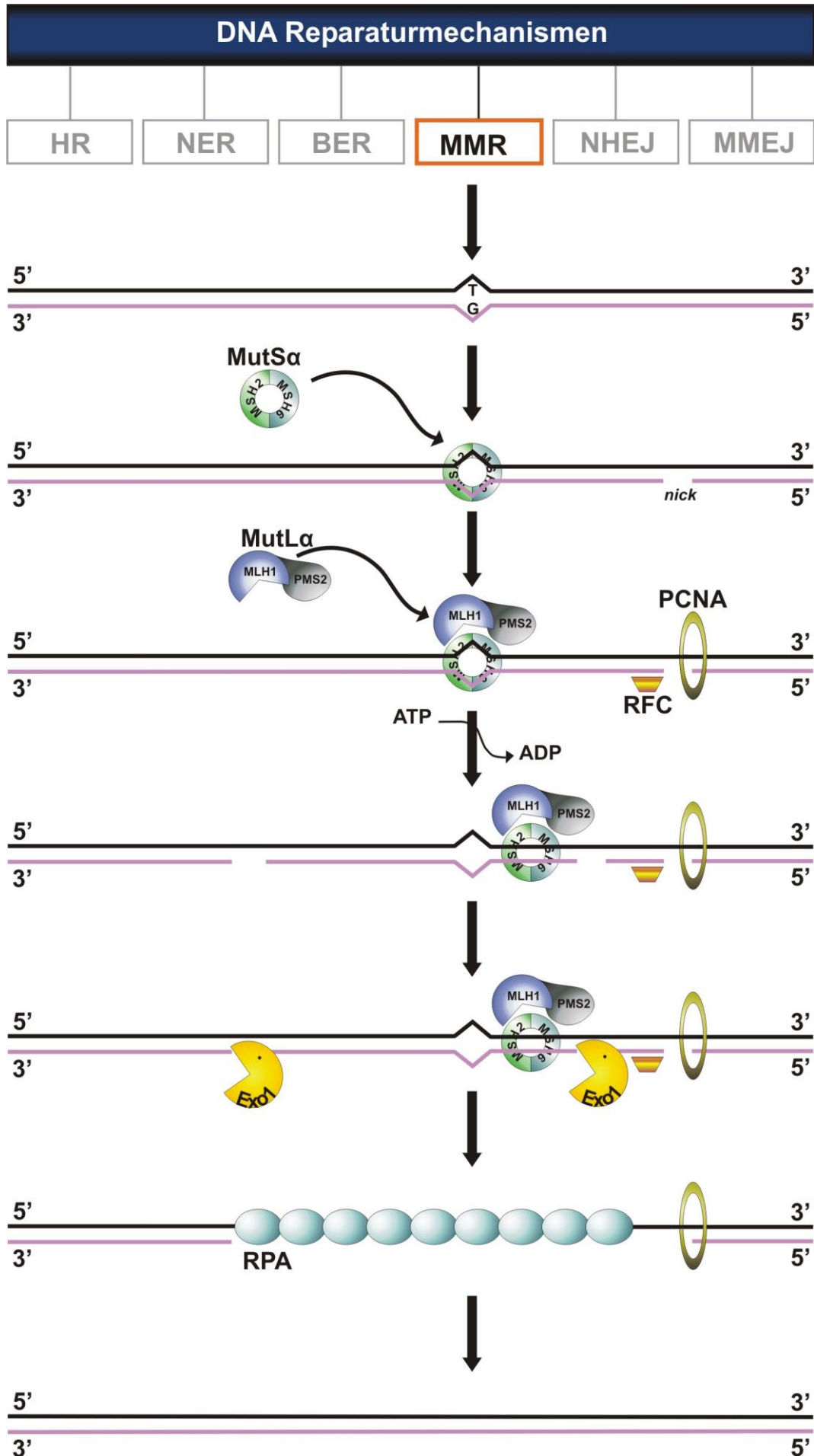


Abbildung 2-4: Überblick über das DNA-Mismatch Reparatursystem in Eukaryonten. Das MutS α -Heterodimer (MSH2/MSH6) bindet an die Basenfehlpaarung und rekrutiert das MutL α -Heterodimer (MLH1/PMS2). Der Austausch von ADP in ATP bewirkt eine Konformationsänderung und die beiden Heterodimere entfernen sich von der Basenfehlpaarung. Durch die Endonukleasefunktion von PMS2 wird eine Lücke in den Tochterstrang eingeführt. Exonuklease I degradiert den fehlerhaften Strang während der einsträngige Matrizenstrang von RPA geschützt wird. Am Ende resynthetisieren Polymerase δ gemeinsam mit seinen Kofaktoren PCNA und RFC den fehlerfreien Tochterstrang mit Hilfe der DNA Ligase I. (nach Mukherjee S. *et al.*, 2010)

HR = Homologe Rekombination, NER = Nukleotidexzisionsreparatur, BER = Basenexzisionsreparatur, MMR = Mismatch Reparatur, NHEJ = Nicht-homologe Endverknüpfung, MMEJ = Mikrohomologie vermittelte Endverknüpfung; PCNA = Proliferating Cell Nuclear Antigen, RFC = Replikationsfaktor C, Exo1 = Exonuklease 1, RPA = Replication Protein A.

2.3.1 Mismatch-Reparatursystem und Lynch-Syndrom

Wie heute bekannt ist, sind die Hauptursache für das Lynch-Syndrom Keimbahnmutationen in den Genen *MLH1* auf Chromosom 3p21.3, *MSH2* auf Chromosom 2p21 und *MSH6* auf Chromosom 2p16.3. Die *International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors* (InSiGHT) hat mittlerweile tausende von Mutationen, welche sich über die gesamten Exons aller Mismatch-Reparaturgene, aber auch des *APC-* (*Adenomatous Polyposis Coli*), *CDH1-* (*E-Cadherin*) und *EPCAM-* (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*) Gens verteilen, in einer Datenbank aufgelistet. Auch die Gene *MSH3* (Chromosom 5q14.1), *PMS1* (Chromosom 2q32.2) und *PMS2* (Chromosom 7q22.1) werden mit der HNPCC assoziiert, sind aber nur für einen kleinen Teil aller Fälle verantwortlich (Hedge M. *et al.*, 2009). Zusammen genommen sind *MLH1* und *MSH2* für über 64% aller Fälle von Keimbahnmutationen in HNPCC-Patienten verantwortlich (Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, *et al.* 1996).

Interessanterweise führen Mutationen des *MLH6*-Gens zu einem unterschiedlichen klinischen Phänotyp, verglichen zu solchen Tumoren, welche durch *MLH1* und *MSH2*-Mutationen verursacht worden sind (geringere Penetranz, häufiger Gebärmutterkrebs, geringe Mikrosatelliteninstabilitätsrate) (Wu Y. *et al.*, 1999). Mutationen der Gene *PMS1* und *PMS2* sollen für rund 5% aller Lynch-Syndrom-Fälle verantwortlich sein; ihre Beteiligung sowie ihr Beitrag zur Pathogenese gelten allerdings als umstritten (Nakagawa H. *et al.*, 2004).

2.4 MLH1

1987 entdeckten Levinson *et al.*, dass in *E. coli* die Inaktivierung von *mutS*- und *mutL*-Genen zu Mikrosatelliteninstabilitäten führte, welche denen in Tumorzellen von HNPCC-Patienten gleich (Levinson G. *et al.*, 1987). 6 Jahre später konnte eine vermutete Verbindung zwischen einem polymorphen Marker auf Chromosom 3p und dem Krankheitsloкус bestätigt werden (Lindblom A. *et al.*, 1993; Nyström-Lahti M. *et al.*, 1994), und zeitgleich identifizierten unabhängig voneinander Papadopoulos und Bronner das dazugehörige Gen auf Chromosom 3p21.3 als *hMLH1* (Papadopoulos, N. *et al.*, Bronner C. *et al.*, 1994).

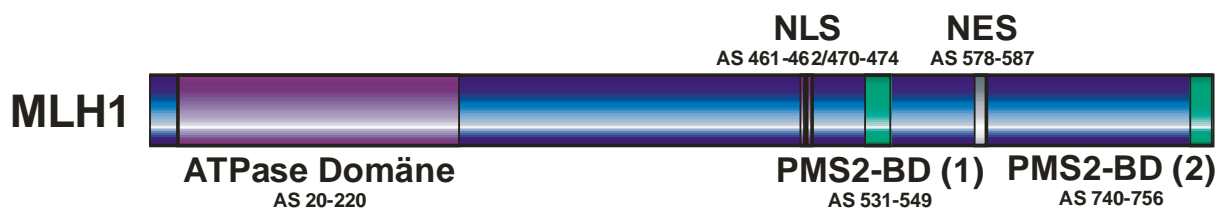


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung des *MLH1*-Proteins

Das Gen besteht aus 19 Exons, welche eine mRNA-Länge von 2524 Basenpaaren ergeben. Das daraus translatierte Protein besteht aus 756 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 84,6 kDa. Im N-Terminus befindet sich eine ATPase-Bindedomäne (Aminosäuren 20-220 (Räschle M. *et al.*, 2002); nach Hydrolyse von ATP kommt es zu einer Konformationsänderung von *MLH1* mit einer N-terminalen Dimerisierung, welche wiederum verschiedene Signalkaskaden in Gang setzt (Tomer G. *et al.*, 2002).

Mittlerweile wurden zahlreiche weitere Interaktionen mit anderen Proteinen (siehe Tabelle 4.) beschrieben, welche MLH1 zumindest theoretisch an vielen unterschiedlichen zellulären Abläufen beteiligen lassen. Zu den experimentell nachgewiesenen Interaktionen gehören beispielsweise die Bindung an PMS2 zur Ausbildung des Heterodimers MutL α , die zwischen den Aminosäuren 531-549 sowie 740-756 stattfindet (Kosinski J. *et al.*, 2010), an Exonuklease I, welche zwischen den Aminosäuren 410 und 650 bindet (Nielsen F. *et al.*, 2004) sowie an MutS α (MSH2/MSH6) im N-Terminus des Proteins (Plotz G. *et al.*, 2006).

Tabelle 4: Interaktionspartner von MLH1		
Protein	Funktion	Quelle (Auswahl)
AIFM	Apoptose	(Cannavo E. <i>et al.</i> , 2007)
ATPase	DNA Metabolismus	(Räschle M. <i>et al.</i> , 2002)
BLM	Synthese / Reparatur	(Dherin C. <i>et al.</i> , 2009)
BRCA1		(Suhasini A. <i>et al.</i> , 2011)
MBD4		(Bellacosa A. <i>et al.</i> , 1999)
ATP-Synthase		(Cannavo E. <i>et al.</i> , 2007)
RAD50		(Wang Y. <i>et al.</i> , 2000)
ATM		(Wang Y. <i>et al.</i> , 2000)
RFC1		(Wang Y. <i>et al.</i> , 2000)
DNA-PKcs		(Cannavo E. <i>et al.</i> , 2007)
BRIP 1	DNA-Helikasen	(Xie J. <i>et al.</i> , 2010)
RuvB-like 1		(Cannavo E. <i>et al.</i> , 2007)
RuvB-like 2		(Cannavo E. <i>et al.</i> , 2007)
PMS2	Mismatch-Reparatur	(Kosinski J. <i>et al.</i> , 2010)
EXO I		(Dherin C. <i>et al.</i> , 2009)
PMS1		(Mastrocola A. <i>et al.</i> , 2010)
MSH4		(Santucci-Darmanin S. <i>et al.</i> , 2000)
MSH2		(Wang Y. <i>et al.</i> , 2000)
MSH6		(Wang Y. <i>et al.</i> , 2000)
MLH3		(Kondo E. <i>et al.</i> , 2001)
MSH3		(Cannavo E. <i>et al.</i> , 2007)

Einleitung

PMS1		(Cannavo E. <i>et al.</i> , 2007)
PCNA		(Hidaka M. <i>et al.</i> , 2005)
Importin α 2	Protein-Import/Export	(Cannavo E. <i>et al.</i> , 2007)
Importin β 1		(Cannavo E. <i>et al.</i> , 2007)
DOCK7	Signaltransduktion	(Cannavo E. <i>et al.</i> , 2007)
MYC	Transkriptionsfaktor	(Mac Partlin M. <i>et al.</i> , 2003)
Ubiquitin	Ubiquitinylierung	(Cannavo E. <i>et al.</i> , 2007)
PSD3		(Cannavo E. <i>et al.</i> , 2007)
UBP2L		(Cannavo E. <i>et al.</i> , 2007)
TAT	Virales Protein	(Gautier V. <i>et al.</i> , 2009)
Angiomotin	Zelladhäsion	(Cannavo E. <i>et al.</i> , 2007)

Das Protein besitzt sowohl diverse Nukleäre Lokalisationssignale (NLS) als auch Nukleäre Exportsignale (NES). Es handelt sich um ein zweiteiliges nukleäres Lokalisationssignal, welches die Aminosäuren 461 und 462 sowie 470 bis 474 umfasst (Leong V. *et al.*, 2009), und ein nukleäres Exportsignal, das sich von Aminosäure 578-586 erstreckt (Brieger A. *et al.*, 2011). Wu *et al.* stellten 2003 die Hypothese auf, dass die Heterodimerisierung von MLH1 mit PMS2 und damit Bildung von MutL α die notwendige Voraussetzung für den nukleären Import darstellt (Wu X. *et al.*, 2003). Eine andere Gruppe konnte aber zeigen, dass allein dieses zweiteilige NLS in der Lage ist, MLH1 selbst oder das Heterodimer MutL α in den Kern zu transportieren und damit auch ein defektes NLS von PMS2 ausgleichen kann (Leong V. *et al.*, 2009). Dieser „piggy-back-Mechanismus“, über welchen MLH1 den Transport anderer Proteine regulieren kann, konnte auch durch andere Gruppen bestätigt werden (Knudsen N. *et al.*; Brieger A. *et al.*, 2007). Das 2011 publizierte nukleäre Exportsignal lieferte des weiteren einen logischen Mechanismus für die Auslösung von Apoptose durch MLH1 nach Induktion von DNA-Schäden, wie er bereits für andere Proteine beschrieben wurde, welche an der apoptotischen Signaltransduktion beteiligt sind (Wang H. *et al.*, 2010; Brieger A. *et al.*, 2011).

Damit zählt MLH1 gemeinsam mit anderen Komponenten des Mismatch-Reparatursystems zu den Proteinen, deren Funktion unter anderem über nukleären Import bzw. Export reguliert wird, wie die Tumorsuppressoren p53 und p21 oder Zellzyklusregulatoren wie Cyclin D1 oder cdc25 (Carmo-Fonseca M., 2002).

Während andere MMR-Proteine wie MSH6 sich auch in Nucleoli aufhalten können, ist MLH1 sowohl nach Auftreten von DNA-Schäden als auch in unbeschädigten Zellen stets außerhalb der Nucleoli zu finden; vermutlich handelt es sich dabei um einen Schutzmechanismus der Zelle, bei Abwesenheit von DNA-Schäden keine unangemessenen Signalkaskaden in Gang zu setzen, indem Subpopulationen von MutS α (MSH2 und MSH6) von MutL α räumlich getrennt werden und die Ausbildung des ternären MutS α /MutL α -Komplex verhindert wird (Mastrocola A. *et al.*, 2010).

Derzeit sind über 6000 Variationen im MLH1-Gen dokumentiert, von denen 205 erwiesenermaßen einen veränderten Phänotyp hervorrufen (Leiden Open Variant Database; 2011).

2.5 BRCA1

Zu Beginn der Neunziger Jahre wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen hereditärem Brustkrebs und einem genetischen Marker auf Chromosom 17 entdeckt. 1990 wurde über Kopplungsanalysen *BRCA1* als erstes Suszeptibilitätsgen für Brustkrebs identifiziert (Hall J. *et al.*, 1990), und in den darauffolgenden Jahren konnte bewiesen werden, dass Keimbahnmutationen von *BRCA1* für die hohe Penetranz von Brust- und Eierstockkrebs bei Frauen verantwortlich waren (Futreal P. *et al.*, 1994; Brody L. und Biesecker B. 1998).

BRCA1 ist an einer Vielzahl von zellulären Funktionen beteiligt, dazu gehören Chromatin-Remodelling, Protein-Ubiquitinierung, DNA-Replikation und -Reparatur, transkriptionelle Regulierung, Zellzykluskontrolle und Apoptose (Linger R. und Kruk P. 2010).

Das *BRCA1*-Gen besteht aus 24 Exons mit 1863 Basenpaaren, welche für ein Protein mit 220 kDa kodieren (Miki Y. *et al.*, 1994). Das Protein enthält im N-Terminus eine Ring-Domäne, über welche diese nach Heterodimerisierung mit dem Protein BARD1 (*BRCA1 associated RING domain protein 1*) E3 Ubiquitin-Ligase-Aktivität ausüben kann (Wu W. *et al.*, 2008), während sich im C-Terminus eine Phosphoproteinbindende (BRCT-Domäne) Domäne bestehend aus zwei Repeats befindet, welche vor allem bei der Translokation des Proteins nach Auftreten von DNA-Schäden eine wichtige Rolle spielt (Manke I. *et al.*, 2003; Rodriguez, J. *et al.*, 2004), aber ebenso an der transkriptionellen Regulierung von *BRCA1* (Monteiro A.N. 2000), der Bindung an Doppelstrangbrüche sowie Zellspreitung und –

motilität (Coene E. *et al.*, 2011) beteiligt ist. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die BRCT-Domäne für die Rekrutierung von P53, BRCA1 und dem Koaktivator p300 an den Promotor von p21^{cip1/WAF1} essentiell ist, indem die BRCT-Domäne methyliertes p300 bindet und damit die Expression von p21^{cip1/WAF1} einleitet (Lee Y. *et al.*, 2011).



Abbildung 2-6: Schematische Darstellung des BRCA1-Proteins

Das prädominant nukleäre BRCA1 bewegt sich über unterschiedliche Mechanismen zwischen Zytoplasma und Nukleus (Scully R. *et al.*, 1996). In Exon 11 befinden sich zwei nukleäre Lokalisationssignale (Aminosäuren 501-507 und 607-614), wobei die erste NLS in der Lage ist, Importin alpha zu binden um dann aktiv durch die Kernmembrane transportiert zu werden (Chen C. *et al.*, 1996). Fabbro *et al.* schlugen einen alternativen Importmechanismus vor, nach welchem BRCA1 über eine Art Huckepack-Mechanismus von BARD1 in den Kern geschleust wird, da für die nukleäre Lokalisation die Anwesenheit der RING-Domäne erforderlich ist. Ebenso soll BARD1 auch den nukleären Export verhindern, indem es die N-terminale nukleäre Exportsequenz (Aminosäuren 22-30) maskiert (Fabbro M. *et al.*, 2002). Eine weitere nukleäre Exportsequenz befindet sich zwischen den Aminosäuren 81-99 und ist für den Transport ins Cytoplasma über Bindung an den Kern-Exportrezeptor CRM1 (*chromosome region maintenance 1*) verantwortlich (Rodriguez J. und Henderson B. 2000).

Die Fähigkeit, sich sowohl im Kern als auch im Zytoplasma aufhalten zu können, ist essentiell für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität durch BRCA1. Im Kern ist es in der Lage, die Reparatur von DNA-Schäden einzuleiten, sofern diese reparabel erscheinen. Im Gegensatz dazu induziert es nach Strahlenschäden unabhängig von p53 Apoptose, sobald es sich im Zytoplasma befindet.

Dies wird vor allem über ein 90 kDa großes Fragment („BRCA1-p90“) vermittelt, welches nach proteolytischem Abbau von BRCA1 über Caspase-3 entsteht. Dieses Fragment stellt den C-Terminus inklusive der BRCT-Domäne von BRCA1 dar und war in Experimenten ausreichend, um zum Zelltod und einer erhöhten Cisplatin-Sensitivierung zu führen (Dizin E. *et al.*, 2008). Eine andere Gruppe konnte 2011 allerdings zeigen, dass der nukleäre Export über direkte Protein-Interaktion der BRCT-Domäne mit p53 und nicht über transkriptionelle Regulierung stattfindet, nachdem p53 die Bindung zwischen BRCA1 und BARD1 unterbindet (Jiang J. *et al.*, 2011). Über den genauen Mechanismus der Apoptoseinduktion wird derzeit allerdings noch spekuliert; beispielsweise könnte Apoptose über Aktivierung des c-Jun N-terminale Kinasen-Signalweges (über H-Ras, MEKK4, JNK, Fas-Ligand und Caspase-9-Aktivierung) (Thangaraju M. *et al.*, 2000), Aktivierung von Caspase-3 nach Phosphorylierung von BRCA1 (Martin S. und Ouchi T. 2005), oder auch über transkriptionelle Deregulierung pro-apoptotischer Gene sowie über Translokation von BRCA1 in Mitochondrien (Maniccia A. *et al.*, 2009) vermittelt werden.

2.5.1 MLH1 und BRCA1

Wang *et al.* waren die ersten, welche einen Zusammenhang zwischen dem Mismatch-Reparaturgen MLH1 und BRCA1 dokumentierten, nachdem sie beide Proteine gemeinsam mit anderen für die genomische Stabilität bedeutsamen Proteinen in einem Komplex identifizierten, den sie *BASC (BRCA1-associated genome surveillance complex)* nannten. Sie vermuteten, dass *BASC* als eine Art Sensor für DNA-Schäden während der Replikation fungiert, da jedes der Proteine in der Lage ist, entweder an abnormale DNA-Strukturen (Doppelstrangbrüche, Basenfehlpaarungen, Holliday-Strukturen u.ä.) zu binden (z.B. RAD50-MRE11-NBS1 oder MLH1 und MSH2-MSH6), oder als Kinasen Signalkaskaden in Gang zu setzen (z.B. ATM, ATR) (Wang Y. *et al.*, 2000).

2006 wurde über zwei rekombinant in *E.coli* exprimierte BRCA1-Fragmente (Aminosäuren 1-231 sowie 1552-1861) eine erste direkte Interaktion mit MLH1 gezeigt, allerdings gegen ebenfalls rekombinantes MLH1 bzw. HeLa-Kernextrakte (Quaresima B. *et al.*, 2006).

Mehrere Gruppen favorisierten jedoch unabhängig voneinander eine indirekte Bindung über FANCD1 (syn. BACH1/BRIP1), eine DNA-Helikase, welche nach Replikationsstress rekrutiert

wird und in der Lage ist, doppelsträngige DNA durch homologe Rekombination zu reparieren (Greenberg R. *et al.*, 2006; Peng M. *et al.*, 2007). Diese Interaktion ist auch insofern von Bedeutung, als sie einen bisher unbekanntem Zusammenhang zwischen dem Mismatch-Reparatursystem und dem Fanconi-Anämie Signalweg aufzeigt, dessen Gene vor allem Ubiquitin-Ligase-Aktivität ausüben und BRCA1 vermutlich dazu benötigen, mit anderen DNA-Reparaturproteinen zu assemblieren oder an den Ort der DNA-Läsionen zu gelangen (Moldovan G. *et al.*, 2009; Williams S. *et al.*, 2011).

2.6 Integrine

Integrine gehören zu einer großen Familie von Rezeptorproteinen, welche vor allem an der Interaktion von Zellen mit der extrazellulären Matrix und Zell-Zell-Adhäsionen beteiligt sind. Diese Interaktionen sind bedeutend für die Embryonalentwicklung, Zellwachstum und -differenzierung, Immunabwehr sowie Hämöostase und Apoptose. Neben ihrer Eigenschaft, über die Verankerung ihrer cytoplasmatischen Domäne mit dem intrazellulären Zytoskelett mechanische Kräfte entlang der Plasmamembran auszuüben, sind sie auch in der Lage, chemische Signale ins Zellinnere weiterzuleiten bzw. auf Signale zu reagieren, welche aus dem Zellinneren über ihre cytoplasmatischen Domänen vermittelt werden (sog. *Outside-In* und *Inside-Out-Signaling*) (Calderwood D. 2004).

Integrine sind heterodimere Transmembranproteine bestehend aus nicht-kovalent verknüpften alpha- und beta-Einheiten, welche jeweils einmal die Membrane durchqueren (Typ1-Transmembranproteine). In Wirbeltieren existieren 18 α - und 8 β -Untereinheiten, die zu 24 verschiedenen Rezeptoren unterschiedlicher Ligandenaffinitäten und Gewebeverteilungen assemblieren können (Campbell I. und Humphries M., 2011). Integrine besitzen einen kurzen transmembranären Bereich und eine kleine cytoplasmatische Domäne ohne Enzymaktivität (von 15-77 Aminosäuren für die α -Integrin-Untereinheiten bzw. von 46-60 Aminosäuren für die β -Integrin-Untereinheiten) (Humphries M. *et al.*, 2003).

Zahlreiche Integrine binden an das R-G-D- (Arginin-Glycin-Asparagin) Motiv, welches beispielsweise bei Fibronektin, Fibrinogen und dem von Willebrand-Faktor gefunden wird.

β 1-Integrine hingegen binden an ICAM1, ICAM2 und ICAM3, die keine R-G-D-Sequenz enthalten.

Neben dieser Möglichkeit, die Integrine aufgrund ihrer Ligandenspezifität zu klassifizieren, existiert auch die Kategorisierung nach Untereinheiten. Innerhalb dieser stellen die β_1 -, β_2 - und α_v -enthaltenden Integrine die größte Gruppe dar. Die α - und β -Untereinheit zeigen keine strukturellen Homologien, aber die verschiedenen Untereinheiten besitzen untereinander konservierte Regionen.

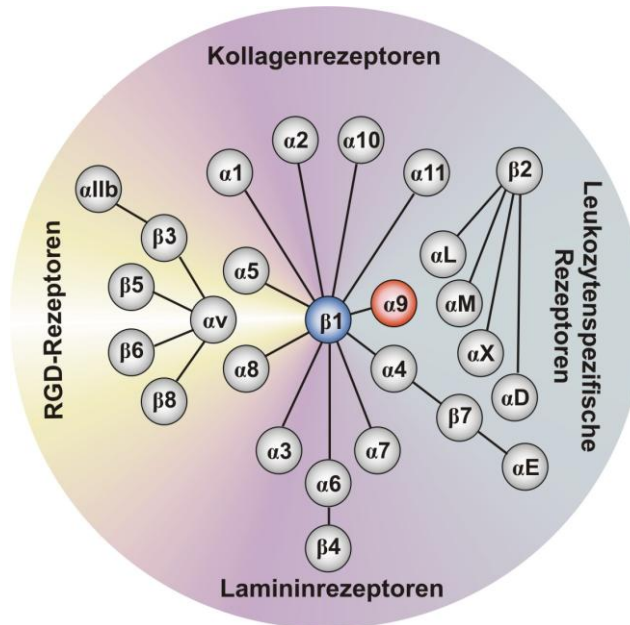


Abbildung 2-7: Integrinrezeptoren im Überblick. 8 β -Untereinheiten können mit 18 α -Untereinheiten 24 verschiedene Integrine bilden.

Die α -Untereinheiten enthalten sieben β -Propellermotive, welche bei neun der α -Ketten von einer I-Domäne unterbrochen sind. Diese I-Domäne enthält eine konservierte Mg^{2+}/Mn^{2+} -Bindungsstelle, die auch als Metallionen-abhängige Adhäsionsstelle („MIDAS“-*Metal-Ion-Dependent Adhesion Site*) bezeichnet wird (Lee J. *et al.*, 1995). Diese sieben β -Propellermotive sind verbunden mit der *thigh*-, *calf-1*- und *calf-2*-Domäne, welche gemeinsam eine Stützstruktur für den Integrinkopf bilden. Die letzten drei oder vier Einheiten des Propellers enthalten Konsensussequenzen für die Bindung von Calciumionen (sog. EF-Hand-Motive) (Barczyk M. *et al.*, 2010). Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Calcium allosterische Effekte auf die Ligandenbindung ausübt (Humphries M. *et al.*, 2003).

Während die I-Domänen der α -Ketten untereinander hohe Sequenzhomologien aufweisen, findet sich in den cytoplasmatischen Domänen bis auf das GFFKR-Motiv eine recht hohe Divergenz, was auf die zahlreichen Funktionen der unterschiedlichen Integrine hinweist (Shattil S. *et al.*, 2010). Das GFFKR-Motiv befindet sich membranproximal und stellt eine hochkonservierte Domäne dar, welche einerseits die Assoziation der Integrine mit der Membrane ermöglicht, gleichzeitig für die Heterodimerisierung der α - mit der β -Untereinheit unentbehrlich ist, und damit wichtige strukturelle und funktionelle Eigenschaft aufweist (Wang W. und Luo B. 2010).

Die β -Untereinheit enthält eine Plexin-Semaphorin-Integrin (PSI)-Domäne, eine Hybriddomäne, eine β I-Domäne (ähnlich der I-Domäne der α -Untereinheiten mit metallionenbindenden Eigenschaften) und vier cysteinreiche *Epidermal Growth-Factor (EGF)*-Wiederholungen (Barczyk M. *et al.*, 2010). Die zum GFFKR-Motiv analoge Domäne in der β -Untereinheit ist die Aminosäurenabfolge LLXXXHDRRE im cytoplasmatischen Teil.

Beim Aufbau fokaler Adhäsionen (Multiproteinkomplexe, die eine Verbindung zwischen Aktinfilamenten und der extrazellulären Matrix herstellen) sind in erster Linie β 1-Integrine beteiligt, indem sie Informationen über Paxillin, Talin und FAK (*Focal Adhesion Kinase*) ins Zellinnere weiterleiten. Die Phosphorylierung von FAK hat die Bindung von Src zur Folge, was wiederum andere Proteine phosphoryliert und dadurch die Verankerung der Membrane mit dem Zytoskelett einleitet (Minuth W. *et al.*, 2003).

Integrine sind in der Lage, sowohl Informationen aus dem Extrazellulärraum ins Zellinnere (*Outside-in*) als auch in die entgegengesetzte Richtung (*Inside-Out*) zu übermitteln. Während des *Inside-Out*-Signalweges binden intrazelluläre Aktivatoren wie Talin oder Kindline an den cytoplasmatischen Teil des β -Integrins. Dies führt zu einer Konformationsänderung, welche mit einer verstärkten Ligandenbindungsaffinität einhergeht. Diese Informationsweiterleitung aus dem Zellinnern hat vor allem Veränderungen der Zellmotilität (Migration, Adhäsion und Spreitung) zur Folge. Im Vergleich hierzu bewirkt Bindung von extrazellulären Liganden eine Signaltransduktion ins Zellinnere, die ebenfalls mit einer Konformationsänderung beginnt; zusätzlich können die Integrine sich bei Bindung multivalenter Liganden in Gruppen zusammenzulagern (zu „*clustern*“). Die Kombination aus beiden Ereignissen löst schließlich weitere Signalkaskaden aus, welche die Zellpolarität, Struktur des Zytoskeletts, Genexpression, Zellüberleben und -proliferation beeinflussen (Shattil S. *et al.*, 2010).

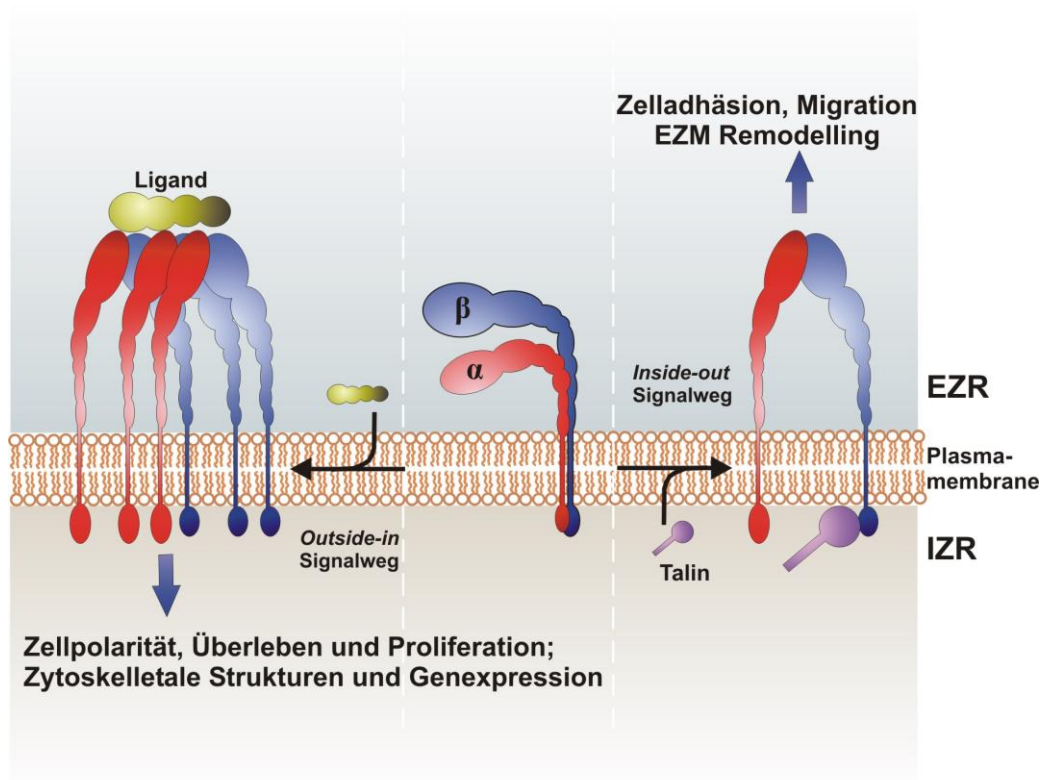


Abbildung 2-8: *Inside-out*- und *Outside-in*-Signalwege von Integrinen. Beim *Inside-out*-Signalweg bindet ein intrazellulärer Aktivator (wie Talin oder Kindline) an den cytoplasmatischen Teil der β -Untereinheit und führt zu einer Konformationsänderung, welche die Affinität für extrazelluläre Liganden erhöht. Diese Aktivierung der Integrine beeinflusst deren Interaktion mit der Extrazellulären Matrix. Der *Outside-in*-Signalweg wird aktiviert, wenn die Bindung extrazellulärer Liganden die Konformation der Integrine verändert. Da solche Liganden meistens multivalent sind, kommt es zu einer Zusammenlagerung („Clustern“) der Integrine. Beide Ereignisse führen schließlich zu intrazellulären Signalen, welche die Zellpolarität, das Zytoskelett, die Genexpression sowie Zellüberleben und –proliferation beeinflussen. (nach Shattil *et al.*, 2010). EZR = Extrazellulärraum; IZR = Interzellularraum

2.7 ITGA9

Das Integrin $\alpha_9\beta_1$ ist ein relativ neues Familienmitglied der β_1 -Familie, das eine hohe Sequenzhomologie zu $\alpha_4\beta_1$ aufweist (Vlahakis N. *et al.*, 2005) und ein Heterodimer aus dem Integrin α_9 (ITGA9) und dem Integrin β_1 darstellt.

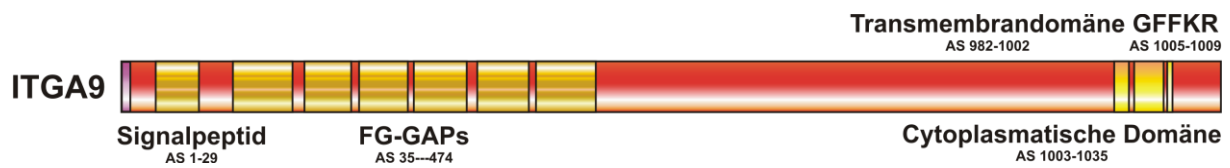


Abbildung 2-9: Schematische Darstellung des ITGA9-Proteins.

Das 115 kDa große Protein besteht aus 1035 Aminosäuren und enthält eine große extrazelluläre Domäne (Aminosäuren 30-981) bestehend aus 4 unvollständigen und 3 vollständigen metallbindenden Domänen, sogenannten *FG-GAPs*, welche zur Bildung des für alpha-Integrine typischen beta-Propeller-Motivs notwendig sind. Diese Region ist vor allem zur Ligandenbindung von Bedeutung. Daneben bilden die ersten Aminosäuren des Proteins das Signalpeptid (Aminosäuren 1-29), welches das Protein/Ribosom an die Membrane des Endoplasmatischen Reticulums (ER) steuert. Dieser Schritt dient nach Abspaltung des Signalpeptids und weiteren posttranslationalen Modifikationen dem späteren Transport des Proteins an die Plasmamembrane. Als Typ-1-Transmembranprotein enthält $\alpha 9$ nur eine einzelne transmembranäre Domäne (Aminosäuren 982-1002). Im Gegensatz zum extrazellulären Teil des Proteins ist die cytoplasmatische Domäne recht kurz (Aminosäuren 1003-1035) und beinhaltet das zur Bindung der beta-Kette notwendige GFFKR-Motiv (Aminosäuren 1005-1009) (Palmer E. *et al.*, 1993).

Es wird in zahlreichen Geweben exprimiert und findet sich auf Epithel-, Endothel-, Muskelzellen, Hepatozyten und Neutrophilen Granulozyten (Palmer E. *et al.*, 1993). Mittlerweile wurden zahlreiche Liganden identifiziert, darunter Tenascin-C, VCAM-1, VEGF-A, -C und -D, Thrombospondin und Osteopontin (Yokosaki Y. *et al.*, 1998; Taooka Y. *et al.*, 1999). Daneben ist es das Integrin mit den meisten Interaktionspartnern innerhalb der ADAM-Metalloproteasen (*A disintegrin and Metalloproteinase*) (Arribas J. *et al.*, 2006). Integrin $\alpha 9$ -defiziente Mäuse durchlebten zwar eine normale Embryonalentwicklung, starben allerdings nach 12 Tagen an Lungenversagen (Huang, X. *et al.*, 2000). Die Vielzahl an Liganden weist auch auf die zahlreichen Funktionen dieses Integrins hin, darunter dessen Fähigkeit, Zellmigration und zu gewissen Teilen auch Zelladhäsion und Tumordinvasion zu fördern.

Der dem zugrunde liegende Mechanismus soll ausschließlich auf den zytoplasmatischen Teil des Integrin α_9 zurückzuführen sein, da dieser in der Lage ist, das Enzym SSAT (Spermidin/Spermin-N-Acetyltransferase) zu binden und gemeinsam mit iNOS (induzierbare NO-Synthase) den für die Migration üblichen Signalweg über die Src- und FAK-Kinase zu aktivieren (Veeravalli K. *et al.*, 2012). Eine andere Gruppe begründet die verstärkte Zellmigration und Tumordinfiltration in Plattenepithelkarzinomzellen mit einer stärkeren Bindung an TNfn₃RAA (*third fibronectin type III repeat of tenascin-C*) und einer damit einhergehenden erhöhten Expression der Matrixmetalloproteasen MMP-2 und MMP-9, welche die Migration durch Degradierung der Extrazellulären Matrix stimulieren (Roy S. *et al.*, 2011). Andere wiederum halten eine Aktivierung des ERK_{1/2}-Signalweges über VEGF-C und D für ursächlich (Taooka Y. *et al.*, 1999). Beschrieben wurde auch eine Aktivierung von PI₃K und ERK nach Bindung einer Spleißvariante von Fibronectin an $\alpha_9\beta_1$, was die epithelial-mesenchymale Transition in Lungenkrebszellen bewirkte (Sun X. *et al.*, 2011). Neben Tumorgenese, Angiogenese und Zellmigration wird ITGA₉ auch in Zusammenhang mit Lymphangiogenese (Vlahakis N. *et al.*, 2005), Granulopoiese (Chen C. *et al.*, 2006) und Wundheilung (Singh P. *et al.*, 2004) gebracht. Eine neue Erkenntnis ist die Beteiligung von ITGA₉ an Rheumatoider Arthritis, indem es über Interaktion mit Tenascin und Osteopontin eine vermehrte Th₁₇-Zytokinausschüttung von Dendritischen Zellen und Makrophagen auslöst (Kanayama M. *et al.*, 2011).

2.8 Das Fusionsprotein MLH1·ITGA9

Das Fusionsprotein MLH1·ITGA₉ wurde erstmals 2009 publiziert, nachdem der Stammbaum einer Familie aus Französisch-Guyana eingehend untersucht wurde. Dieser Stammbaum erstreckte sich über 5 Generationen und dokumentierte 54 Familienmitglieder, von denen 22 an Dickdarmkrebs oder anderen Tumoren erkrankt waren. Obgleich die Familie die zur Diagnose des Lynch-Syndrom herangezogenen Amsterdam-Kriterien II erfüllte, entsprach das Spektrum der beobachteten extrakolonischen Tumore (zusätzlich Brust-, Leber- und Nierenkarzinome) nicht dem einer typischen Lynch-Syndrom-Familie.

Über MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*)-Analyse wurde eine Deletion der Exons 12 bis 19 des *MLH1*-Gens festgestellt; ausgehend von dieser Erkenntnis konnte über LDI (*long-distance inverse*)-PCR und anschließender Sequenzierung eine genomische Fusion des Intron II (nt 5099) vom *MLH1*-Gen mit dem Intron 16 (nt 4334) des etwa 400 kb *downstream* ebenfalls auf Chromosom 3p21.3 gelegenen Gens *ITGA9* identifiziert werden. Innerhalb dieser 400 Kilobasen befindet sich ein Teil der AP20-Region, einem Chromosomenabschnitt auf 3p21.3, welcher bei zahlreichen Karzinomen Deletionen aufweist und daher in Verbindung mit Tumorsuppressorgenen gebracht wird (Kashuba V. et al., 2004; Senchenko V. et al., 2004).

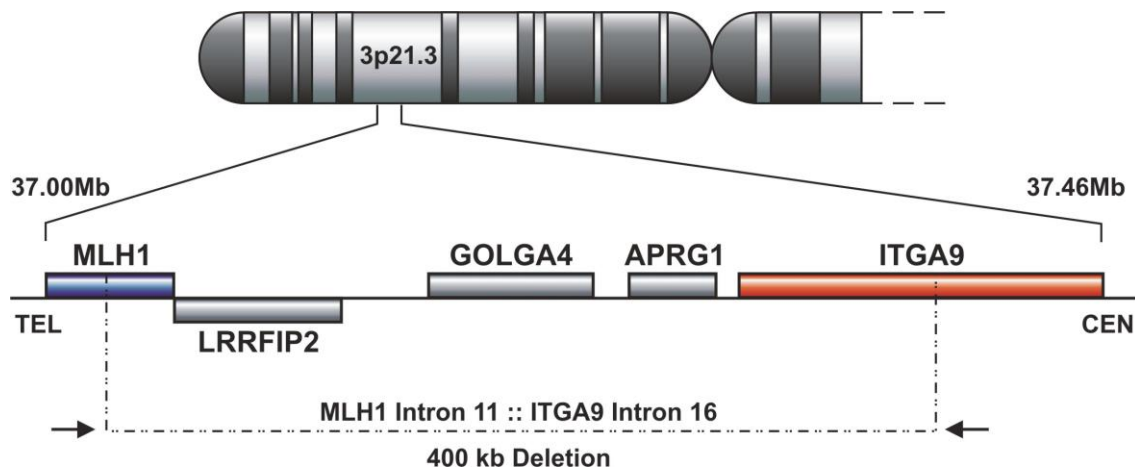


Abbildung 2-10: Schematische Darstellung der interstitiellen Deletion auf Chromosom 3p21.3.

Diese Fusion wurde über mehrere Generationen hinweg bei insgesamt 7 von 9 getesteten Patienten entdeckt und entspricht damit einer Keimbahnmutation. Durch die Fusion beider Gene kommt es nicht nur zu einem Verlust der drei dazwischen liegenden Gene *LRRFIP2*, *GOLGA4* und *APRG1*, sondern durch den intakt gebliebenen offenen Leserahmen zu einem vollständig translatierbaren neuartigen Protein, dessen Funktion bis auf seine fehlende Mismatch-Reparaturfähigkeit (fehlende PMS-Bindedomäne) noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Meyer C. et al., 2009).

Das entstehende Fusionsgen besteht aus 2307 Basenpaaren, welche für ein 85 kDa großes Protein mit 769 Aminosäuren kodieren. Davon stammen die ersten 1038 Basenpaare vom *MLH1*-Gen (dies entspricht den Aminosäuren 1-346), während die restlichen 1269 Basenpaare (bp 1039-2307, entsprechend den Aminosäuren 347-769) mit dem C-Terminus von ITGA9 korrespondieren (entsprechend den Aminosäuren 613-1035 des Wildtyp-ITGA9).

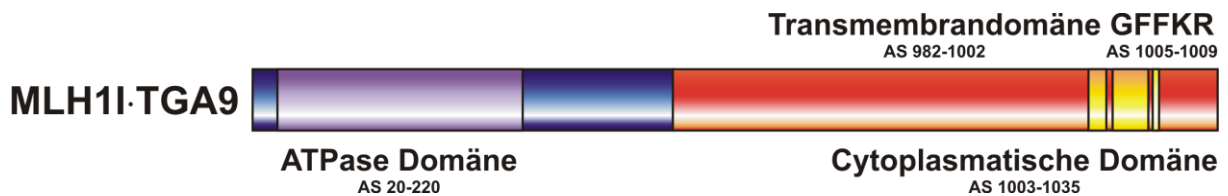


Abbildung 2-11: Schematische Darstellung des Fusionsproteins MLH1-ITGA9.

Aufgrund des fehlenden MLH1 C-Terminus, welcher unter anderem die Bindedomäne für PMS2 und EXO1 beherbergt, muss davon ausgegangen werden, dass das Fusionsprotein nicht mehr in der Lage ist, für die Bildung von MutL α zur Verfügung zu stehen und somit auch keine Basenfehlpaarungsreparatur durchführen kann. Diese fehlende Reparaturfähigkeit konnte bereits in einem *single-bp Mismatch*-Reparaturassay unter Beweis gestellt werden (Meyer C. *et al.*, 2009).

Desweiteren ist durch die interstitielle Deletion das Nukleäre Lokalisationssignal von MLH1 (im Wildtyp: Aminosäuren 461-462 bzw. 470-474) abhanden gekommen, was zumindest theoretisch einen nukleären Import über diese Sequenz ausschließt.

Auch das Fehlen diverser N-terminaler Strukturen des Integrin $\alpha 9$ hat hypothetische Konsequenzen; zum einen fehlt die Signalsequenz, welche für den Transport in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums und damit Lokalisation in der Plasmamembran notwendig ist; des weiteren ist die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle größtenteils nicht vorhanden. Andererseits sind sowohl die hydrophobe Transmembrandomäne als auch das GFFKR-Motiv erhalten geblieben.

3 Zielsetzung

Das hereditäre kolorektale Karzinom ohne Polyposis (HNPCC) bildet mit einer Prävalenz von 3-5 % aller kolorektalen Karzinome die häufigste Entität der autosomal dominant vererbten Dickdarmkreberkrankungen (Schulmann K. *et al.*, 2004). Das nach seinem Entdecker benannte Lynch-Syndrom zeichnet sich durch das zusätzliche Auftreten extrakolonischer Tumoren sowie einer verkürzten Adenom-Karzinom-Sequenz aus, welche eine Senkung des mittleren Erkrankungsalters und eine beschleunigte Karzinogenese zur Folge hat. Ein weiteres Merkmal dieser Tumoren ist deren hochgradige Mikrosatelliteninstabilität, eine Eigenschaft, welche auf eine Fehlfunktion mindestens einer der Mismatch-Reparaturgene *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS2* zurückzuführen ist (Görgens H. *et al.*, 2007). Rund die Hälfte aller Lynch-Syndrom-Fälle wird durch Mutationen des Gens *MLH1* verursacht (Kosinski J. *et al.* 2010), den größten Teil dieser Mutationen stellen Basensubstitutionen und Deletionen dar (Leiden Open Variation Database 2011).

Mit dem 2009 veröffentlichten Fusionsprodukt *MLH1*·*ITGA9* wurde erstmals eine vollständig translatierbare Fusion eines Mismatch-Reparaturgens mit dem 400 kb *downstream* gelegenen Gen *ITGA9* beschrieben, welche trotz des aberranten C-Terminus des *MLH1*-Gens den offenen Leserahmen beibehält und daher zu einem neuartigen Fusionsprotein führt.

Ziel der Arbeit war in erster Linie, die hypothetischen Konsequenzen, welche sich aus der Fusion bzw. den deletierten Genabschnitten der Wildtypgene ableiten lassen, experimentell zu untermauern bzw. zu widerlegen.

Die Lokalisation des Fusionsproteins sollte über Fluoreszenzmikroskopie, Immunohistochemische Analyse oder konfokale Laserscanning-Mikroskopie festgestellt werden.

Zur Charakterisierung des Proteins sollten Fusionskonstrukte aus *MLH1*·*ITGA9* und einem N- bzw. C-terminalen Strep-Tag in HEK 293T transfiziert und anschließend aufgereinigt werden. Die aufgereinigten Proteine inklusive potentieller Interaktionspartner sollten anschließend über Massenspektrometrie oder Immunopräzipitation und Western-Blot-Analyse eingehender untersucht werden.

Zielsetzung

Diverse funktionelle Analysen sollten der genaueren Aufklärung des mutmaßlich durch das Fusionsprotein ausgelösten Pathomechanismus dienen, darunter Zellmigration- oder Apoptose-Assays.

Zusammengefasst sollten die Ergebnisse aus unterschiedlichen experimentellen Ansätzen einen möglichen Zusammenhang darstellen zwischen dem Fusionsprotein MLH1·ITGA9 und dem Auftreten maligner Tumore, wie sie in dem Stammbaum der Familie aus Französisch-Guyana beschrieben worden sind.

4 Ergebnisse

4.1 Klonierungen

4.1.1 pEXPR-IBA-MLH1·ITGA9, -MLH1 Δ , - Δ ITGA9, -ITGA9^{wt} und -MLH1^{wt}

Zu Beginn der Klonierung standen folgende Plasmide zur Verfügung: pcDNA3.1-l4 (enthält MLH1·ITGA9), pcDNA3.1-(+)-MLH1^{wt} und pTRE2-puro-ITGA9^{wt}.

Zunächst war eine Umklonierung in zwei pEXPR-IBA (IBA GmbH) Säugetier-expressionsvektoren notwendig, die eine Expression der gewünschten Proteine entweder mit einem N- oder einem C-terminalen *Strep-Tag* ermöglicht und dadurch eine affinitätschromatographische Aufreinigung aus Säugerzellen mittels *Strep-Tactin*-Matrizes erlauben sollte.

4.1.2 pEXPR-IBA-MLH1·ITGA9

Ausgehend von pcDNA3.1-l4 (entspricht „pcDNA3.1(-)-MLH1·ITGA9“) wurden die letzten 317 Basen des C-Terminus (ITGA9-Ende) gegen eine Sequenz ohne Stop-Codon über BamHI und KpnI ausgetauscht („pcDNA3.1(-)-MLH1·ITGA9 Δ Stop“). Zeitgleich wurde die „*multiple cloning site*“ (MCS) aus pEXPR-IBA103 derart modifiziert, dass die Schnittstellen für EcoRI und BamHI entfernt und durch die für NheI, EcoRV und KpnI ersetzt wurden („ENKX-Linker“). MLH1·ITGA9 wurde schließlich aus pcDNA3.1(-)-MLH1·ITGA9 Δ Stop ausgeschnitten und in den modifizierten pEXPR-IBA103 ligiert; die cDNA des Transgens wurde *in-frame* mit dem C-terminalen *Strep-Tag* fusioniert.

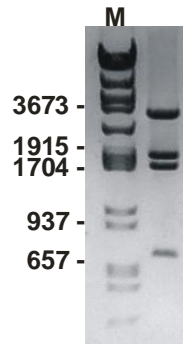


Abbildung 4-1: Testverdau pEXPR-IBA-MLH1-ITGA9 mit HindIII/XmnI (erwartete Größen: 3378 kb, 1947 kb, 1739 kb, 749 kb)

4.1.3 pEXPR-IBA-MLH1 Δ

Die trunkierte Variante (= der MLH1-Teil der Fusion; 1044bp) wurde über PCR an pcDNA3.1-(-)-MLH1-ITGA9-EGFP generiert, NheI/KpnI geschnitten und in den pEXPR-IBA103-Vektor ligiert, dessen MCS gegen den ENKX-Linker ausgetauscht wurde.

4.1.4 pEXPR-IBA-MLH1wt

Zur Klonierung des Wildtypes musste erst der C-Terminus über eine PCR an pcDNA3.1-(+)-MLH1wt amplifiziert und die Wildtypsequenz gegen eine ohne Stop-Codon ausgetauscht werden (= pcDNA3.1-(+)-MLH1wt Δ Stop). Anschließend wurde das gesamte Gen über BamHI/XhoI ausgeschnitten und in pEXPR-IBA103 ligiert.

4.1.5 pEXPR-IBA-ITGA9 Δ MLH1

Die C-terminale Variante der Fusion (= der ITGA9-Teil der Fusion; 1269 bp) wurde ebenfalls über PCR an pcDNA3.1-(-)-MLH1-ITGA9-EGFP generiert, EcoRV/XhoI geschnitten und in pEXPR-IBA103 ligiert.

4.1.6 pEXPR-IBA-ITGA9^{wt}

Das gesamte Gen ITGA9 wurde erst aus pTRE2_puro_ITGA9^{wt} ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pcDNA3.1(-) ligiert (= pcDNA3.1(-)-ITGA9^{wt}); anschließend wurde die C-terminale Sequenz gegen eine über PCR amplifizierte Sequenz ohne Stop-Codon über EcoRI/KpnI ausgetauscht. Das gesamte Gen wurde schließlich über XbaI und KpnI ausgeschnitten und in pEXPR-IBA103 ligiert.

4.1.7 pcDNA-MLH1·ITGA9_EGFP

Die Fusion aus MLH1·ITGA9 und EGFP wurde generiert, indem EGFP über PCR an pTarget_EGFP amplifiziert und über KpnI/AflII in pcDNA3.1(-)-MLH1·ITGA9 Δ Stop ligiert wurde.

4.1.8 pcDNA-MLH1 Δ ITGA9_EGFP

Zur Klonierung der EGFP-getaggten Variante von MLH1 wurde diese erst über PCR amplifiziert und anschließend über NheI/KpnI in pcDNA3.1(-)-MLH1·ITGA9-EGFP ligiert, nachdem MLH1·ITGA9 rausgeschnitten worden ist.

4.1.9 pcDNA-MLH1^{wt}_EGFP

Die Fusion aus MLH1^{wt} und EGFP wurde kloniert, indem die gesamte cDNA ohne Stop-Codon (aus pcDNA3.1(+)-MLH1^{wt} Δ Stop) über NheI und KpnI ausgeschnitten und in pcDNA3.1(-)-MLH1·ITGA9_EGFP ligiert wurde, nachdem MLH1·ITGA9 entfernt war.

4.1.10 pcDNA-BRCA1-N-flag und pcDNA-BRCA1-C-flag

Die Klonierung der beiden Interaktionsdomänen BRCA1-N und -C erfolgten in analoger Weise, nachdem sie über eine PCR an einem BRCA1-cDNA-Klon (imagene; Vektor PCRbluntII-TOPO) amplifiziert wurden. Anschließend wurden sie über XhoI/EcoRV in den Vektor pcDNA3.1(-) ligiert. Das Flag-Tag wurde mit den gewünschten Schnittstellen von der Firma Eurofins erworben und schließlich über EcoRV/HindIII in die Vektoren pcDNA3.1(-)-BRCA1-N bzw. -C eingefügt.

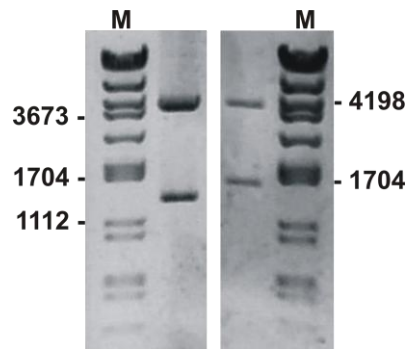


Abbildung 4-2: Testverdau pcDNA_BRCA1-N (links) und -C (rechts) mit NotI/Spel (erwartete Größen: 4292 und 1398 kb bzw. 4292 und 1650 bp).

4.1.11 pDsRed_BRCA1 (fulllength)

Das gesamte BRCA1-Gen (5603 Basen) sollte in den Zielvektor pDsRed-N1 (clontech) kloniert werden, welches mit einem rot fluoreszierenden Protein (*DsRed*-Monomer) versehen ist. Als erstes sollte die MCS durch eine 78 Basenpaare lange Linkersequenz ersetzt werden, welche folgendermaßen aufgebaut ist:

```

      XhoI      MluI      AflII      EcoRV      ScaI      NruI      SacI      HindIII      AgeI
      |         |         |         |         |         |         |         |         |
ccgctcgcgagc ggcgacgcggt cgcttaagga tatcaaaaagt actttttcgc gacgagctcg cccaagcttg ggacgggt
  p l e r r r v a - g y q k y f f a t s s p k l g t g
>>.....BRCA1 Linker.....>>
    
```

Dementsprechend wurde die gesamte cDNA über Amplifizierung einzelner Fragmente an einem BRCA1-cDNA-Klon und anschließender Ligation in pDsRed-N1 eingefügt. Die Fragmente waren folgendermaßen zusammengesetzt:

Fragment a: XhoI---AflII (1424 bp)

Fragment b: AflII---ScaI (1731 bp)

Fragment c: ScaI---SacI (1433 bp)

Fragment d: SacI---AgeI (1007 bp)

Das mittlere Fragment (von Schnittstelle AflII bis SacI; 3164 Basen) wurde nicht über PCR amplifiziert, sondern aus PCRbluntII-TOPO_BRCA1 ausgeschnitten, während Fragment a und d über PCR generiert und in den Vektor pGEM®-T (Promega) zwischenkloniert wurden. Anschließend wurden die geschnittenen Amplimere in den Zielvektor ligiert. Da sich das Farbtage DsRed in immunohistochemischen Experimenten als unzureichend erwies, wurde dieses später über AgeI/NotI gegen mCherry ausgetauscht.

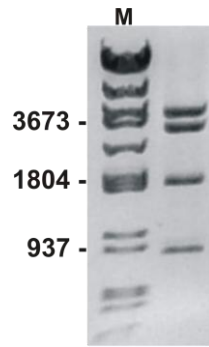


Abbildung 4-3: Testverdau pDsRed-BRCA1 mit AflII und Agel (erwartete Größen: 4173, 3328, 1803 und 932 bp).

4.1.12 pTRE2puro_MLH1·ITGA9, pTRE2puro_MLH1ΔITGA9 und pTRE2puro_ITGA9ΔMLH1

Ausgehend vom Vektor pTRE2puro_ITGA9wt wurden die Konstrukte pTRE2puro_MLH1·ITGA9, pTRE2puro_MLH1ΔITGA9 und pTRE2puro_ITGA9ΔMLH1 kloniert, indem über NotI/EcoRV ITGA9wt entfernt und durch die anderen über PCR generierten cDNAs ersetzt wurde. Sowohl pTRE2puro_ITGA9wt als auch pTRE2puro_MLH1wt standen bereits zur Verfügung.

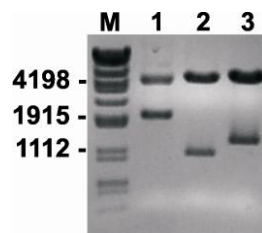


Abbildung 4-4: Testverdau pTRE2puro_MLH1·ITGA9 (1), pTRE2puro_MLH1ΔITGA9 (2) und pTRE2puro_ITGA9ΔMLH1 mit NotI und EcoRV (erwartete Größen: Vektor 5074 bp und Inserts 2316 bp (1), 1050 bp (2) bzw. 1281 bp (3)).

4.2 Aufreinigung von MLH1·ITGA9 über Streptactin-Säule und -Sephrose

Das *Strep-Tag* ist eine Peptidsequenz, die intrinsische Affinität zu dem Protein Streptavidin aufweist. Mit dem *Strep-Tag* fusionierte gentechnisch produzierte Proteine können aus dem Wirtszellextrakt an einer Affinitätssäule mit immobilisiertem Streptavidin bzw. mit Hilfe von Streptavidin-*beads* chromatographisch gereinigt werden. Eluiert wird selektiv durch Zugabe des natürlichen Liganden Biotin, der an die selbe Tasche des Streptavidins bindet. Vorteile liegen in der hohen Selektivität, der effizienten Elution und den milden Chromatographiebedingungen (beispielsweise gegenüber der Aufreinigung mit Hilfe von 6-fach *His-tag*) (Skerra A. 2003).

Die Proteinkomplexe wurden sowohl über eine 50%ige Suspension (*Strep-Tactin* Sepharose) als auch über fertig gepackte Säulchen aufgereinigt, wobei die über Säulchenaufreinigung gewonnenen Eluate aufgrund der höheren Bindungskapazität der Säulchen und des höheren Reinheitsgrades der weiteren Analyse über NanoLC-MS/MS unterzogen wurden. Für Western-Blot-Analysen waren die Aufreinigungen mit Hilfe der Suspension ausreichend.

Als Wirtszellen dienten Humane embryonale Nierenfibroblasten (HEK 293T), welche mit den pEXPR-IBA-Konstrukten transient mittels Polyethylenimin (PEI) transfiziert wurden. Nach 48 Stunden wurden die Zellen lysiert, unspezifische Biotinbindungen mit Avidin blockiert und die Lysate anschließend über Nacht bei 4°C mit *Strep-Tactin*-Sephrose inkubiert bzw. 2 Mal durch *Strep-Tactin*-Säulchen laufen gelassen. Die Elution erfolgte mit einer 2 mM (Säulchen) bzw. 10 mM (Suspension) Biotin-Lösung.

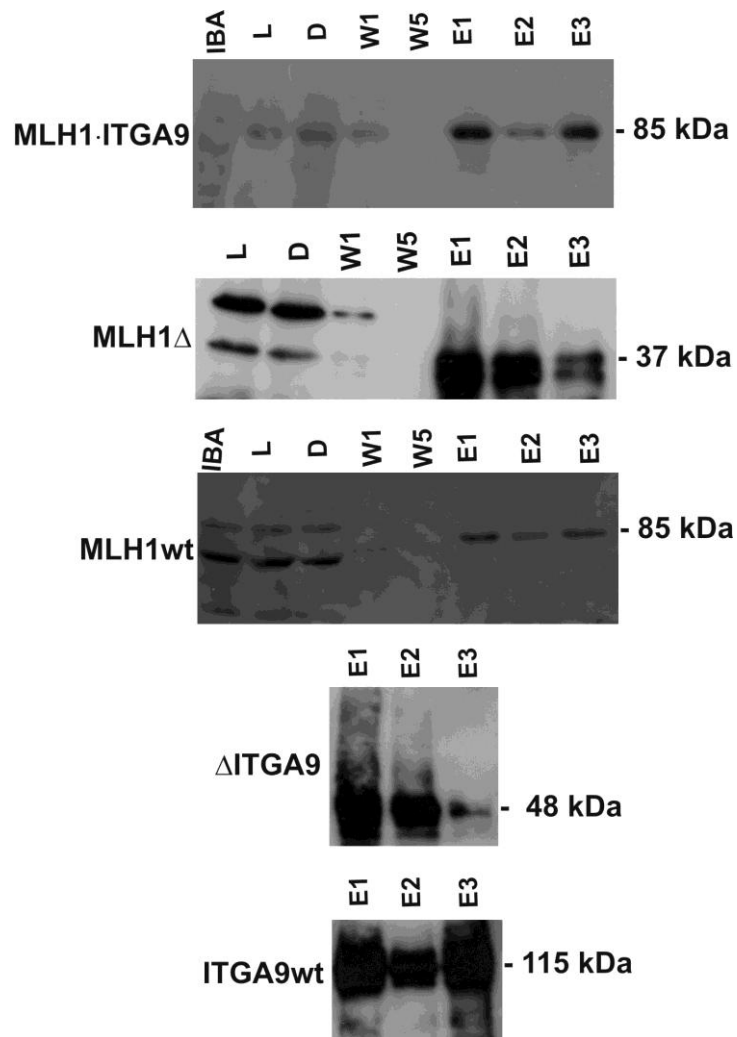


Abbildung 4-5: Über *Strep*-Tactin aufgereinigte Konstrukte. IBA = mit Leervektor transfizierte Zellen, M-I = MLH₁-ITGA₉, MΔI = MLH₁Δ, ITΔM = ΔITGA₉, Mwt = MLH₁wt und ITwt = ITGA₉wt; L = Lysat, D = Durchlauf, W₁ und W₅ = Waschfraktionen, E₁-E₃ = Elutionsfraktionen.

Zur Überprüfung der Aufreinigung dienten Coomassie-gefärbte SDS-Gele sowie Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen MLH₁ bzw. ITGA₉; als Negativkontrollen dienten untransfizierte bzw. Leervektor-transfizierte Zellen sowie mit MLH₁wt bzw. ITGA₉wt transfizierte Zellen. Desweiteren wurde die Anwesenheit des Fusionsproteins über Reverse Transkriptase-PCR an cDNA transfizierter Zellen sichergestellt.

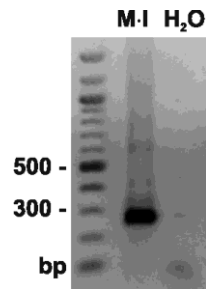


Abbildung 4-6: Überprüfung der Expression von MLH1-ITGA9 in transfizierten HEK293T-Zellen

4.3 Analyse des Proteinkomplexes mittels NanoLC-MS/MS

Zur Identifikation von interagierenden Proteinen sollten Banden, welche im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Zelllysaten zusätzlich auftraten, ausgeschnitten und über Massenspektrometrie analysiert werden.

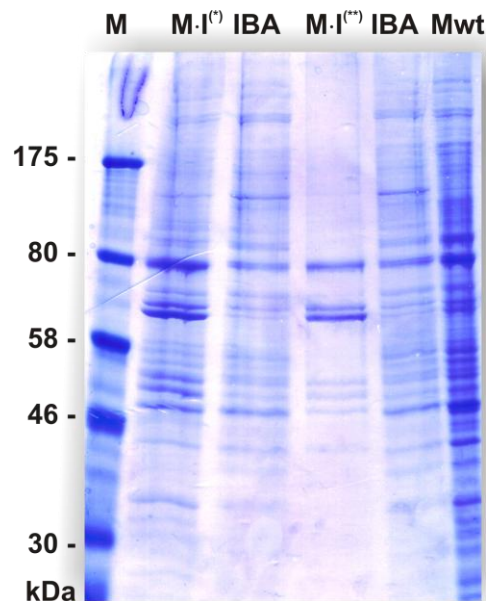


Abbildung 4-7: Kolloidal-Coomassie gefärbtes SDS-Gel unterschiedlicher Elutionen. M = Marker, M-I(*) = Elution MLH1-ITGA9 über Sepharose aufgereinigt; IBA = Leervektor; M-I(**) = Elution MLH1-ITGA9 über *Strep*-Tactin-Säulchen aufgereinigt; Mwt = Elution MLH1wt

Ergebnisse

Wie auf dem Gelbild (siehe Abb. 4-7) zu sehen ist, gab es allerdings weder bei der Aufreinigung mittels Suspension noch bei der Aufreinigung über die *Strep*-Tactin-Säulchen zusätzliche Banden, welche hätten ausgeschnitten werden können. Daher wurden alle Elutionen mit deutlichen Proteinsignalen im Western Blot (siehe Abb. 4-8) gepoolt und für die weitere Analyse verwendet.

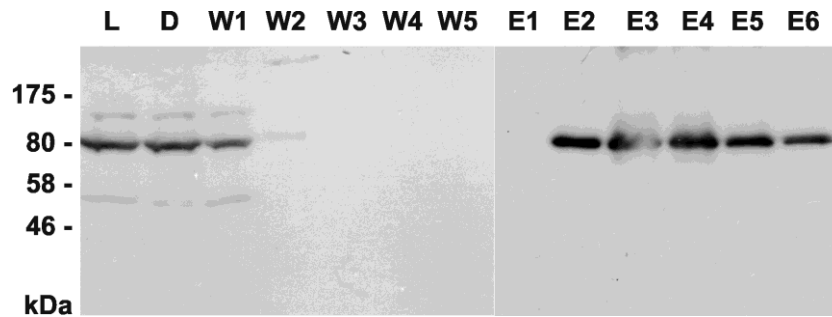


Abbildung 4-8: Western Blot (α -MLH1) von der Säulenaufreinigung IBA₁₀₅-MLH1-ITGA9 (85kDa, sichtbar bei 80 kDa).

Als erstes mussten die gesammelten Elutionsfraktionen umpuffert werden, um störendes Biotin zu beseitigen; dazu diente Ammoniumbicarbonatlösung. Der In-Lösung-Verdau erfolgte mit der in der Proteomanalyse üblichen Serinprotease Trypsin, welches Peptidbindungen spezifisch am Carboxyende der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet. Als Negativ- bzw. Vergleichskontrollen dienten parallele Elutionen aus Zelllysaten, welche zuvor mit dem Leervektor pEXPR-IBA transfiziert wurden. Die massenspektrometrische Analyse lieferte allerdings keine Proteine, welche nicht auch in der Negativkontrolle auftauchten. Alternativ wurde zum Umpuffern Triethylammoniumbicarbonat (TEAB) verwendet, was allerdings zum selben Ergebnis führte.

Als nächstes wurde versucht, eine Protease mit geringerer Spaltungsspezifität zu verwenden. Elastase spaltet spezifisch am C-Terminus kleinerer neutraler Aminosäuren und hat sich als erfolgreich erwiesen bei der Untersuchung von Membranproteinen sowie des Phosphorylierungsstatus von Einzelproteinen (Rietschel B. *et al.*, 2009). Auch diese Modifikation führte zu keinem nennenswerten Ergebnis.

Ergebnisse

Da eine unzureichende Stabilität des gesamten Proteinkomplexes vermutet wurde, bot sich die Verwendung von Crosslinkern an. Crosslinker bieten die Möglichkeit, auch solche Protein-Protein-Interaktionen über kovalente Bindung zu festigen, welche *in vivo* beispielsweise nur transient bestehen (z.B. bei der Signaltransduktion) oder zu schwach sind, um gemeinsam isoliert zu werden. Verwendet wurden die beiden Crosslinker BS³ (Bis-(Sulfo-Succinimidyl)-Suberat) und DTBP (Dimethyl-3,3'-Dithiobispropionimidat). BS³ ist nicht membrangängig, wasserlöslich, lässt sich nicht abspalten und eignet sich daher vor allem für die Analyse von Zelloberflächenproteinen oder Rezeptor-Ligand-Interaktionen. DTBP hingegen ist membrangängig und lässt sich wieder abspalten (mit Hilfe von DTT). Es reagiert mit primären Aminen und besitzt daher ein breites Anwendungsspektrum.

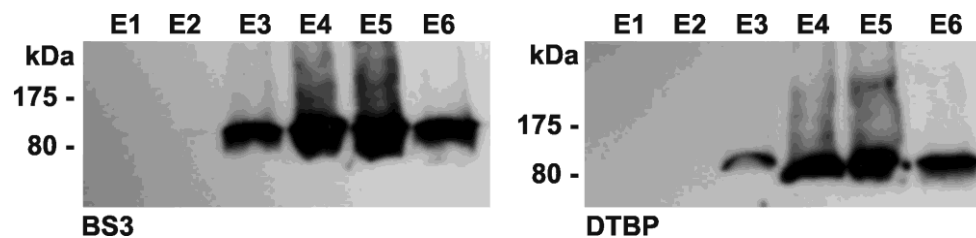


Abbildung 4-9: Western Blot (α -MLH1) der Elutionsfraktionen von der Säulenaufreinigung IBA105-MLH1-ITGA9 unter Verwendung von den Crosslinkern BS³ und DTBP.

Auch hier wurden die Elutionsfraktionen, welche die deutlichsten Proteinsignale im Western Blot zeigten, gepoolt, verdaut und anschließend massenspektrometrisch analysiert. Zu den neu identifizierten Proteinen zählen unter anderem S100A7 (Psoriasis; Uniprot Acc. Number P31151), S100A8 (Calgranulin A; Uniprot Acc. Number P05109) und S100A9 (Calgranulin B; Uniprot Acc. Number P06702); kleine calciumbindende Proteine mit diversen Funktionen (unter anderem auch als Entzündungs- und Tumormarker eingesetzt). Diese Proteine tauchten zwar nicht in der Negativkontrolle auf; die geringe Anzahl an gefundenen Peptiden (2-3) lässt allerdings den Schluss zu, dass es sich eher um Artefakte als um neu identifizierte Bindepartner von MLH1-ITGA9 handelt. Daraus wurde geschlossen, dass keine neuen Bindepartner für das MLH1-ITGA9 Fusionsprotein gefunden werden konnten.

4.4 Lokalisation von MLH1·ITGA9

Um die Lokalisation des MLH1·ITGA9 Fusionsproteins festzustellen, wurde als erstes ein eGFP-Fusionskonstrukt verwendet (MLH1·ITGA9::eGFP) und transient in HEK293T-Zellen transfiziert. Um eine potentielle Kolo­kalisierung mit der Plasmamembran festzustellen, wurden die Zellen zusätzlich mit einem Aktin-Antikörper gegen Aktin markiert; der Kern wurde mittels DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gegengefärbt.

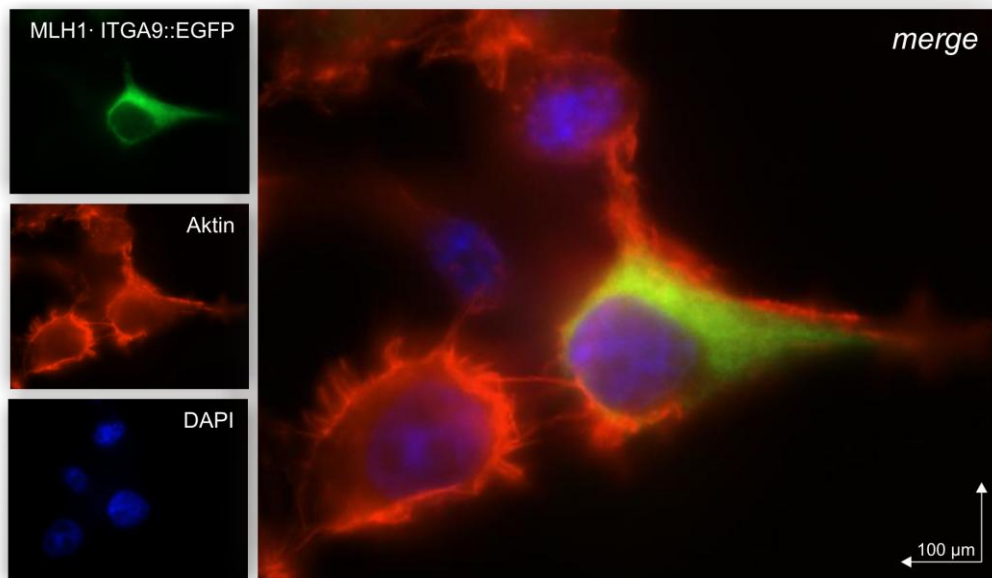


Abbildung 4-10: Lokalisation von MLH1·ITGA9::eGFP in HEK293T-Zellen.

Wie erwartet wurde das Fusionsprotein aufgrund der fehlenden NLS im MLH1-Fragment nur außerhalb des Zellkerns gefunden; auch eine Kolo­kalisierung mit Aktin wurde nicht festgestellt.

Um dieses Ergebnis genauer zu überprüfen, wurde die Lokalisation in einem zweiten, unabhängigen immunohistochemischen Experiment analysiert. Hierzu wurde das Expressionsplasmid pcDNA3.1(-)-MLH1·ITGA9 transient in HEK293T transfiziert und die Zellen anschließend nach 48 Stunden mit einem Antikörper gegen den N-Terminus von MLH1 sowie mit einem Antikörper gegen den C-Terminus von ITGA9 für jeweils eine Stunde inkubiert.

Ergebnisse

Nach drei Waschschrritten erfolgte die Inkubation mit Fluorochrom-konjugiertem Zweitantikörper. Da die beiden Primärantikörper aus unterschiedlichen Organismen (Maus bzw. Kaninchen) stammen, war es möglich, unter Einsatz von fluorochromierten Zweitantikörpern, welche gegen die Wirtsspezies der Primärantikörper gerichtet sind, sowohl den N- als auch den C-Terminus des Fusionsproteins zu visualisieren. In diesem Fall war der Zweitantikörper gegen anti-MLH1 mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) versehen, während anti-ITGA9 über den rot fluoreszierenden Farbstoff Phycoerythrin (PE) sichtbar gemacht wurde. Auch hier wurden die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt.

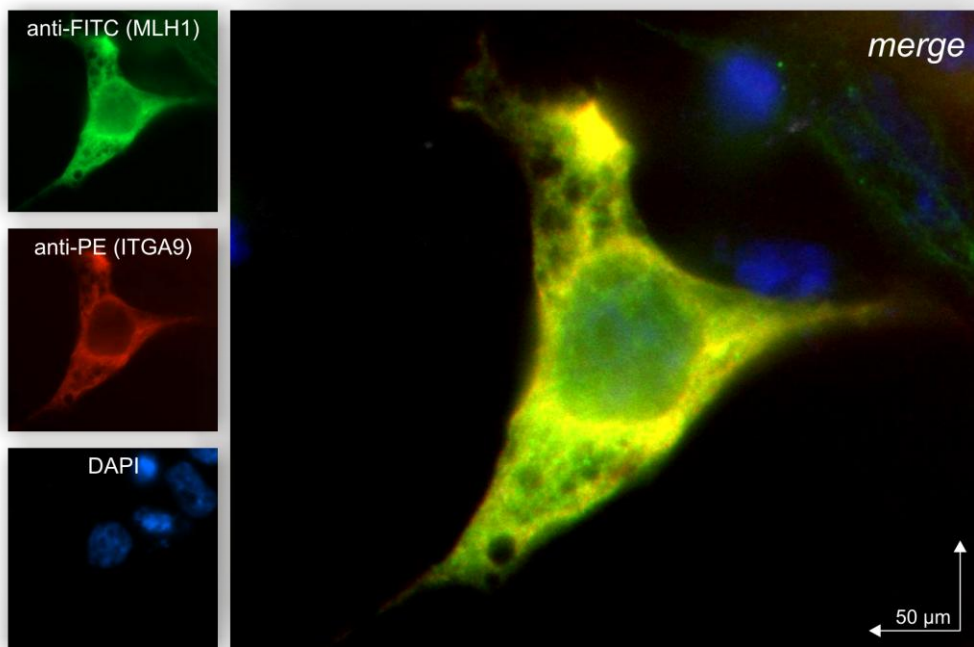


Abbildung 4-11: Immunohistochemische Analyse von MLH1·ITGA9::EGFP in HEK293T-Zellen.

Da dem ITGA9-Anteil des MLH1·ITGA9 Fusionsproteins das Signalpeptid durch den Rekombinationsprozess verloren ging, sollte es dem Fusionsprotein theoretisch unmöglich sein, über das endoplasmatische Retikulum in die Zellmembran transportiert zu werden.

Um dies zu überprüfen, wurden ca. $5 \cdot 10^7$ HEK293T-Zellen mit pcDNA3.1(-)-MLH1-ITGA9 transfiziert und anschließend jeweils nach 24 bzw. 48 Stunden mit oder ohne einem Detergens (Triton X-100) behandelt, um die Zellmembrane zu permeabilisieren. Durch diesen Permeabilisationsschritt sollten die oben erwähnten Primärantikörper die intrazellulären Proteine erfassen, während bei einer ausbleibenden Permeabilisation lediglich sich auf der Oberfläche befindliche Proteine detektiert werden sollten. Nach Inkubation mit beiden Primärantikörpern (eine Stunde in 3% BSA/PBS) wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen, bevor sie erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den Zweitantikörpern inkubierten. Abschließend erfolgten drei Waschschriffe und die Zellen wurden sofort durchflusszytometrisch vermessen. Als Positivkontrolle dienten Zellen, welche mit einem Primärantikörper gegen das Integrin β_1 behandelt wurden.

Da bereits in vorausgegangenen Lokalisationsstudien festgestellt wurde, dass sich der Großteil der Fusionsproteine ausschließlich im Zytoplasma aufhält, ging es bei der durchflusszytometrischen Analyse um die Frage, ob das Protein in der Lage ist, sich in der Zellmembrane zu verankern und wenn ja, in welcher Orientierung. Daher sollte bei einer Lokalisation in der Zellmembran der Anteil an Fluorochrom-markierten Zellen betrachtet werden, wenn diese zuvor ohne Detergens behandelt wurden und die Antikörper somit nicht in der Lage waren, die Membrane zu passieren (siehe Abb. 4-12). Als Negativkontrollen dienten unbehandelte, nicht markierte Zellen und als Positivkontrolle für ein extrazelluläres Staining Integrin- β_1 -markierte HEK293T-Zellen. Eine Expression von endogenem ITGA9 in der verwendeten Zelllinie wurde vorher über RT-PCR überprüft und ausgeschlossen.

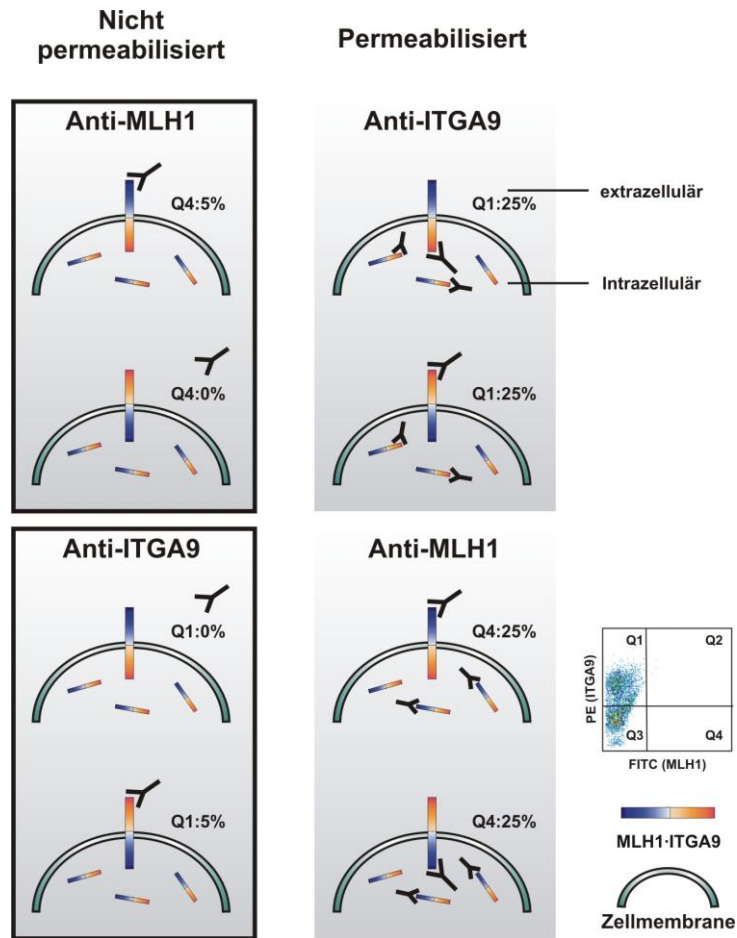


Abbildung 4-12: Schematischer Versuchsaufbau der durchflusszytometrischen Lokalisationsanalyse von MLH1-ITGA9 in HEK293T-Zellen. Angenommen wird ein detektierbarer extrazellulärer Anteil von 5% bzw. ein intrazellulärer Anteil von 20%.

Wie den durchflusszytometrischen Daten zu entnehmen ist, konnte der Großteil der Proteine lediglich detektiert werden, wenn die Zellen zuvor mit Detergens behandelt wurden. Daher ist davon ausgehen, dass sich das Fusionsprotein ausschließlich im Zytoplasma aufhält.

Ergebnisse

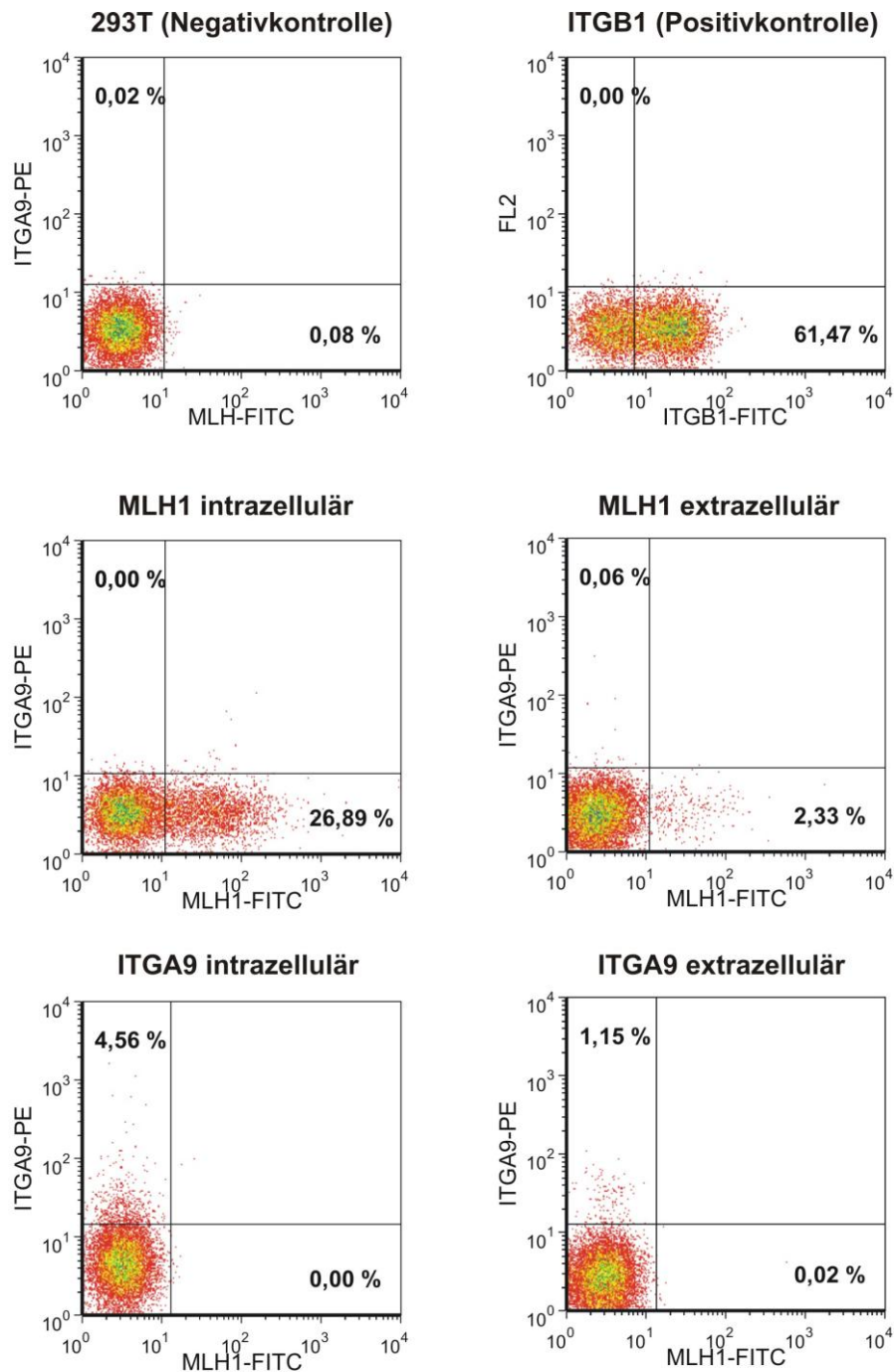


Abbildung 4-13: Durchflusszytometrische Analyse des Fusionsproteins zur Aufklärung der Lokalisation; NK = Negativkontrolle (unmarkierte Zellen); PK = Positivkontrolle (Integrin- β 1 markierte Zellen); M-I = MLH1-ITGA9 transfizierte Zellen, entweder intra- oder extrazellulär mit α -MLH1- oder α -ITGA9-Antikörper sowie fluorchromkonjugiertem Zweitantikörper markiert. FITC = MLH1, PE = ITGA9

Ergebnisse

Auch eine weitere immunohistochemische Analyse transfizierter Zellen, welche dieses Mal an einem konfokalen Laserscanningmikroskop untersucht wurden, zeigten kein abweichendes Ergebnis (siehe Abb. 4-14), ebenso die zeitlich aufgelöste Aufnahme einer sich spreitenden Zelle (siehe Abb. 4-15).

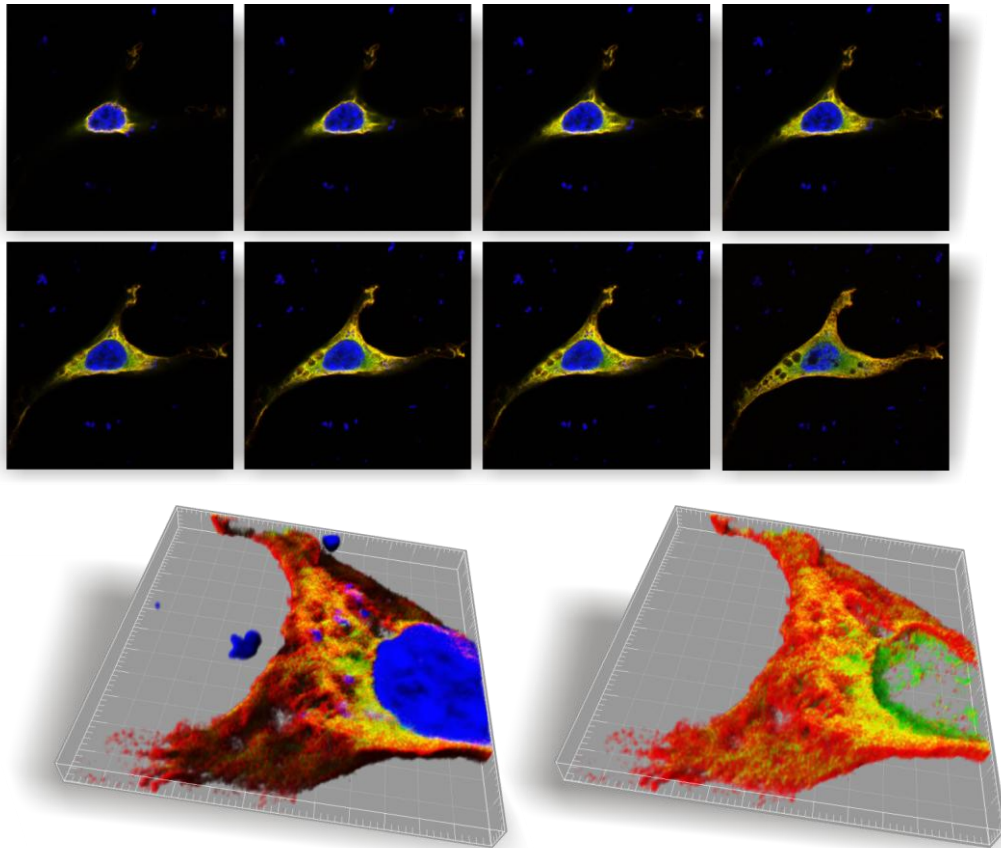


Abbildung 4-14: CLSM-visualisierte HEK293T-Zellen, die das Fusionsprotein MLH1-ITGA9 exprimieren. α -MLH1 = FITC, α -ITGA9 = PE

Ergebnisse

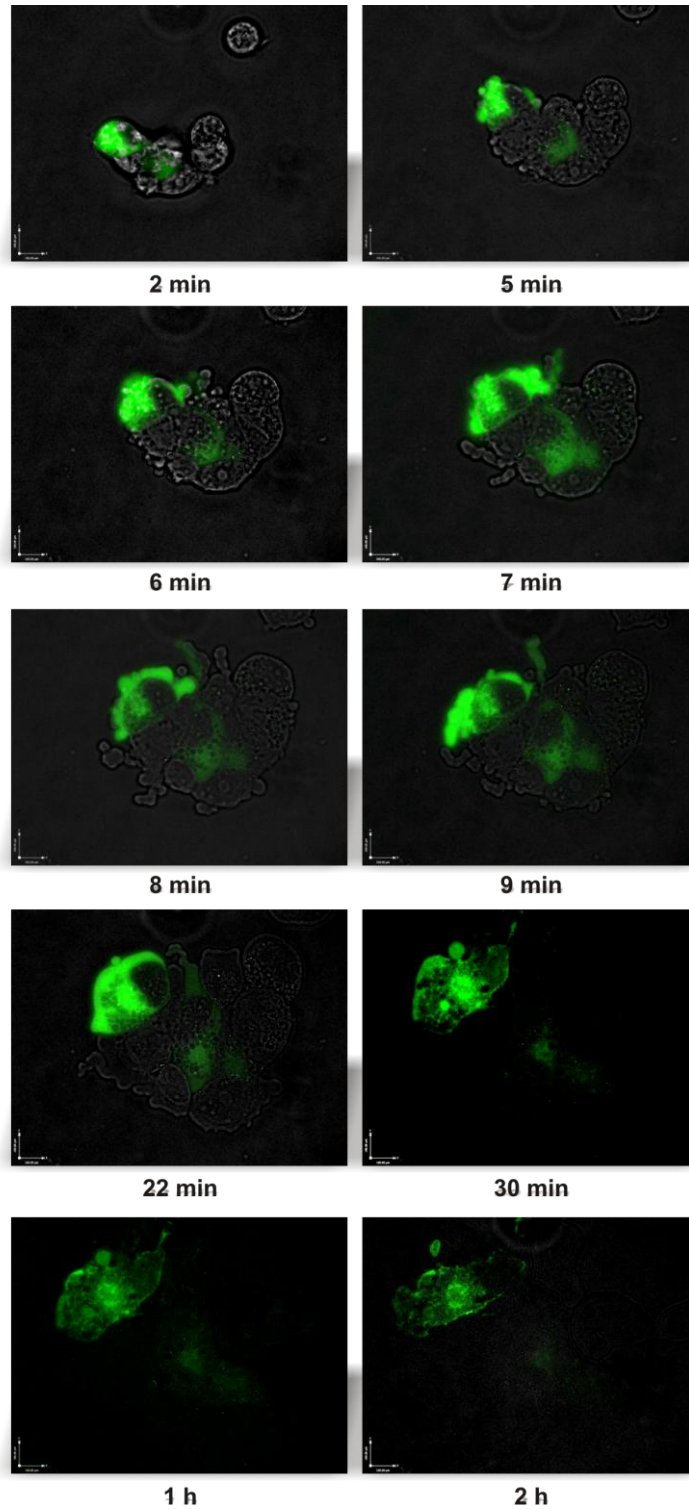


Abbildung 4-15: Zeitlich aufgelöste Aufnahme einer sich spreitenden Zelle, die mit MLH1-ITGA9::EGFP transfiziert wurde.

4.5 Co-Immunopräzipitationen

Interaktionen zwischen Proteinen sind eine entscheidende Grundlage aller Lebensprozesse und können beispielsweise zur Aufklärung pathomolekularer Mechanismen beitragen. Die Analyse dieser Wechselwirkungen ist daher für die Entschlüsselung der Funktion eines Proteins unerlässlich.

Es existieren zahlreiche Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen, eine davon ist die Co-Immunopräzipitation. Hierbei werden Proteine an spezifische Antikörper gebunden, welche von Protein A oder G präzipitiert werden. Diese Proteine sowie interagierende Proteine können anschließend über Western Blot Analyse nachgewiesen werden. Da das Fusionsprotein MLH1-ITGA9 in normalen Zellen nicht vorhanden ist, mussten die Zielzellen (HEK293T) erst damit transfiziert werden. Bei der Analyse endogener Proteine besteht oft das Problem, dass sie in geringen Mengen nicht nachweisbar sind; in diesen Fällen musste neben dem Fusionsprotein auch das zu untersuchende Protein transfiziert werden. Eine weitere Möglichkeit neben der Co-Immunopräzipitation endogener Proteinkomplexe besteht darin, Proteine erst aufzureinigen und anschließend präzipitierte Proteine über Western Blot Analyse nachzuweisen. Die Aufreinigung des Fusionsproteins erfolgte über das *Strep*-tag/*Strep*-Tactin-System (siehe Kapitel 4.2).

Bevor mit den Immunopräzipitationsversuchen begonnen wurde, wurde die Expression vermuteter Interaktionspartner in HEK293T über Reverse Transkriptase-PCR überprüft. Diese Proteine wurden ausgewählt, weil sie bereits in der Literatur als Interaktionspartner für die Wildtyp-Proteine MLH1 und ITGA9 beschrieben wurden.

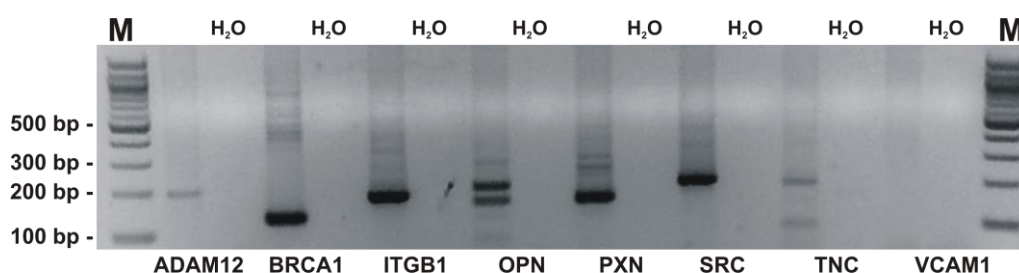


Abbildung 4-16: Reverse Transkriptase-PCR von vermuteten Interaktionspartnern von MLH1-ITGA9 in HEK293T. ADAM12 = *Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 12*; BRCA = *Breast Cancer 1, early onset*; ITGB1 = *Integrin β 1*; OPN = *Osteopontin*; PXN = *Paxillin*; SRC = *Src Kinase*; TNC = *Tenascin*; VCAM1 = *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*

Aus den Ergebnissen der Reverse Transkriptase-PCR lässt sich ableiten, dass alle Interaktionspartner bis auf VCAM1 in HEK293T-Zellen exprimiert werden.

Für die Co-Immunoprecipitationsversuche wurden die Interaktionspartner BRCA1, ITGB1, PXN und SRC ausgewählt. BRCA1 wurde 2000 gemeinsam mit MLH1 in dem Superkomplex BASC (*BRCA1-associated Genome Surveillance Complex*) gefunden, einem Proteinnetzwerk bestehend aus verschiedenen Tumorsuppressorgenen und DNA-Reparaturproteinen wie ATM (*Ataxia Telangiectasia mutated*), BLM (*Bloom syndrome*) und dem RAD50-MRE11 (*Meiotic Recombination-11*)-NBS (*Nijmegen Breakage Syndrome*) Proteinkomplex. Die Hauptaufgabe dieses Komplexes besteht in der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität während der DNA Replikation, indem rechtzeitig DNA-Schäden erkannt und gegebenenfalls repariert werden, oder in anderer Weise adäquat auf die Schäden reagiert wird (beispielsweise durch Einleitung von Apoptose) (Wang Y. *et al.*, 2000).

ITGB1 (*Integrin β 1*), PXN (*Paxillin*) und SRC sind ebenfalls beschriebene Bindepartner des Wildtyp Integrins α 9. Die Assoziation mit dem 130 kDa großen Integrin β 1 gilt als Grundvoraussetzung für die Ausbildung eines funktionellen heterodimeren Integrins. Da die Bindedomäne für ITGB1 im Fusionsprotein MLH1-ITGA9 noch vorhanden ist, sollte überprüft werden, ob die Heterodimerisierung noch möglich ist.

Paxillin ist ein 68 kDa großes Adapterprotein, welches in der Lage ist, über seinen Amino-Terminus direkt an α -Integrine zu binden und bei der Ausbildung fokaler Adhäsionen mitzuwirken. Es wurde beobachtet, dass Paxillin nach Bindung an den cytoplasmatischen Teil des Integrin α 9 eine verstärkte Zellmigration und verringerte Zellspreitung zur Folge hat (Young B. *et al.*, 2001).

Ergebnisse

Src-Tyrosinkinasen können integrinabhängig Signalwege aktivieren, welche entscheidende Rollen für Zellbewegungen und –proliferation spielen. Gupta *et al.* postulierten, dass SRC an die cytoplasmatische Domäne des Integrin α g binden kann, dadurch weitere Signalproteine rekrutiert und somit die Ausbildung eines multimeren Signalkomplexes hervorruft. Dieser wiederum aktiviert die Induzierbare Stickstoffmonooxid Synthase (iNOS) und bewirkt eine verstärkte Produktion von Stickstoffmonooxid (NO). NO aktiviert cGMP und die Protein Kinase G-Signalkaskade, was schließlich zu einer verstärkten Zellmigration führt (Gupta S. *et al.*, 2010).

Circa $5 \cdot 10^7$ HEK293T-Zellen wurden mit pEXPR-IBA-MLH1-ITGA9 transfiziert und nach 48 Stunden lysiert. Nach Absättigung des Lysates mit Protein G Agarose erfolgte bei 4°C über Nacht die Inkubation mit 2-5 μ g Primärantikörper (α -BRCA1, α -ITGB1, α -PXN und α -SRC) pro Ansatz sowie 30-50 μ l Protein G Agarose. Nach Elution mit Lämmli-Puffer erfolgte die Detektion des Fusionsgens über Western Blot Analyse entweder mittels α -MLH1 (BRCA1) oder α -ITGA9 (ITGB1, PXN und SRC). Als Negativkontrolle dienten untransfizierte bzw. mit Leervektor transfizierte 293T-Zellen; Zellen, welche mit den Wildtypgenen MLH1 bzw. ITGA9 transfiziert wurden, dienten als Positivkontrolle für die Antikörper.

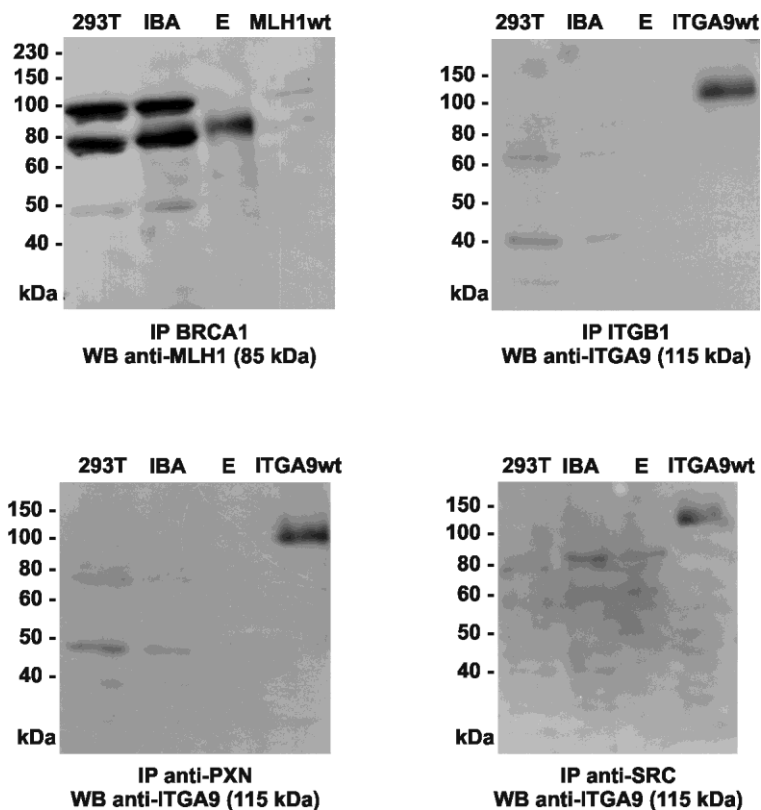


Abbildung 4-17: Co-Immünpräzipitationsexperimente in HEK293T-Zellen, welche zuvor mit pEXPR-IBA-MLH1-ITGA₉ transfiziert wurden; präzipitiert wurden BRCA₁, ITGB₁, PXN und SRC. Über Western Blot sollten MLH1 bzw. ITGA₉ nachgewiesen werden. 293 = Negativkontrolle (untransfizierte Zellen); IBA = mit Leervektor transfizierte Zellen; E = Elutionsfraktion; IP = Immunpräzipitation; WB = Western Blot.

In den Elutionsfraktionen der Co-Immünopräzipitation von BRCA₁ konnte erfolgreich das Fusionsprotein nachgewiesen werden, wobei die Positivkontrolle nur sehr schwach zu sehen war. Im Gegensatz hierzu war weder für das Integrin β_1 noch für Paxillin oder SRC eine Interaktion mit dem Fusionsprotein nachweisbar.

Diese positive Interaktion zwischen BRCA₁ und dem Fusionsprotein wurde anschließend eingehender untersucht. Es existieren zwei postulierte Interaktionsdomänen im BRCA₁-Protein, an welche Wildtyp MLH1 direkt binden sollte; dies sind im N-Terminus die Aminosäuren 1-231 sowie im C-Terminus die Aminosäuren 1552-1861 (Quaresima B. *et al.*, 2006). Diese beiden Fragmente wurden in den Expressionsvektor pcDNA_{3.1}(-) kloniert und mit einem *flag*-Tag versehen („pcDNA_{3.1}-BRCA₁-N“ und „pcDNA_{3.1}-BRCA₁-C“). Anschließend wurden HEK293T-Zellen entweder mit pcDNA_{3.1}-BRCA₁-N (27 kDa) oder mit pcDNA_{3.1}-BRCA₁-C (37 kDa) sowie pEXPR-IBA-MLH1-ITGA₉ transfiziert, die Fragmente entweder über einen C-terminal bindenden BRCA₁-Antikörper oder einen *flag*-Antikörper präzipitiert und die Fusion über Western Blot-Analyse nachgewiesen. Da es sich bei BRCA₁ um einen Bindepartner des Wildtyp-MLH1 Proteins handelt, sollte zeitgleich untersucht werden, ob allein der MLH1-Teil des Fusionsproteins in der Lage ist, mit den beiden BRCA₁-Fragmenten zu interagieren. Daher wurden auch Zellen mit pEXPR-IBA-MLH1 Δ (37 kDa) sowie einem der beiden BRCA₁-Fragmente transfiziert. Als Positivkontrolle dienten wieder Zellen, die Wildtyp-MLH1 exprimierten. Da HEK293T-Zellen aufgrund einer Promotorhypermethylierung MLH1 defizient sind, mussten zusätzlich Zellen, welche den Wildtyp exprimieren sollten, mit pEXPR-IBA-MLH1wt (85 kDa) transfiziert werden.

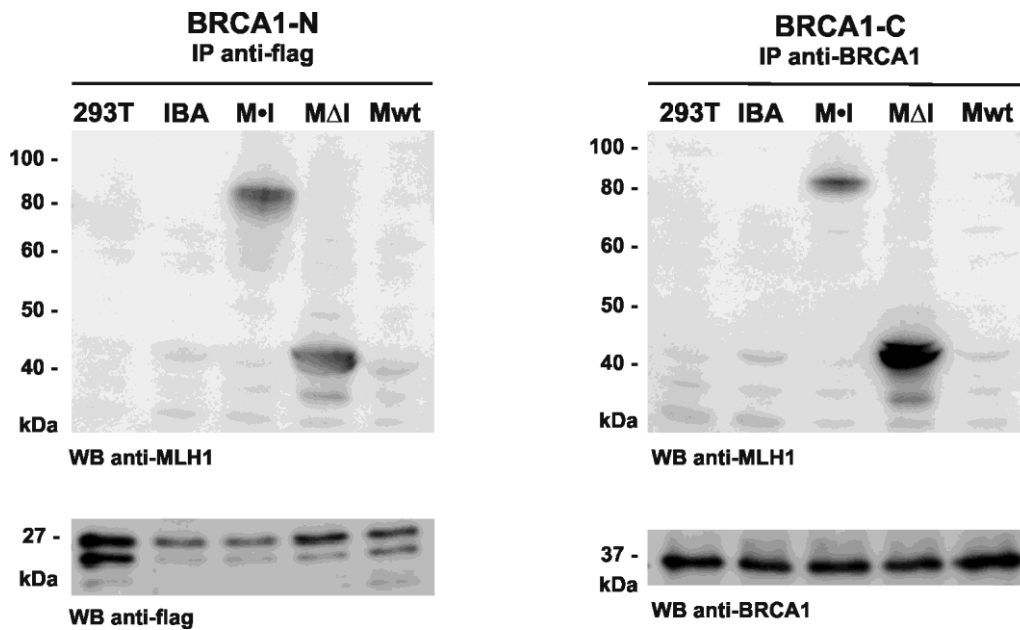


Abbildung 4-18: Co-Immünpräzipitationsexperimente in HEK293T-Zellen, welche zuvor mit pEXPR-IBA-MLH1-ITGA9 und pcDNA3.1-(-)-BRCA1-N bzw. -C transfiziert wurden; präzipitiert wurden jeweils die BRCA1-Fragmente; über Western Blot sollten MLH1-ITGA9 (M-I; 85 kDa), MLH1Δ (MΔI; 37 kDa) sowie wtMLH1 (Mwt; ca. 80 kDa) nachgewiesen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das Fusionsprotein MLH1-ITGA9 als auch die trankierte Variante MLH1Δ in der Lage ist, an beide Fragmente des BRCA1-Proteins zu binden. Um zu überprüfen, ob dies auch mit dem gesamten BRCA1-Protein möglich ist, wurden die Co-Immünpräzipitationsexperimente in Zellen wiederholt, welche entweder endogenes BRCA1 exprimieren oder welche zuvor mit einem BRCA1-Expressionsvektor transfiziert wurden. Hierzu wurde in mehreren Schritten das gesamte BRCA1-Gen in den Vektor pDsRed-N1 kloniert und anschließend über Sequenzanalyse überprüft.

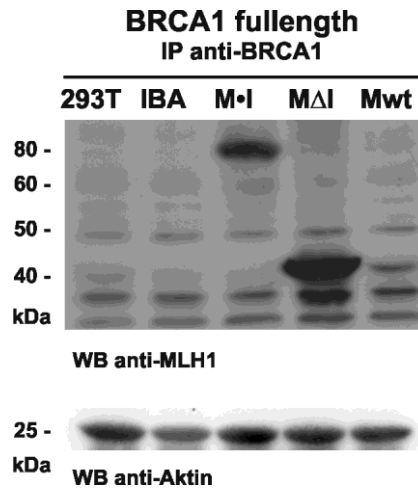


Abbildung 4-19: Co-Immunpräzipitationsexperimente in HEK293T-Zellen, welche zuvor mit pEXPR-IBA-MLH1·ITGA9 und pDsRed-BRCA1 transfiziert wurden; präzipitiert wurde BRCA1; über Western Blot sollten MLH1·ITGA9 (M·I; ca. 85 kDa), MLH1Δ (MΔI; ca. 37 kDa) sowie wtMLH1 (Mwt; ca. 85 kDa) nachgewiesen werden.

4.6 Immunohistochemische Analyse der Interaktion mit BRCA1

Die in der Immunopräzipitation beobachtete Interaktion zwischen BRCA1 und MLH1·ITGA9 bzw. MLH1Δ sollte *in vivo* noch eingehender untersucht werden. Ausgehend von der Hypothese, dass sowohl MLH1·ITGA9 als auch MLH1Δ nur im Zytoplasma zu finden sind, während es sich bei BRCA1 um ein *shuttle*-Protein handelt, sollte immunhistochemisch überprüft werden, ob die Interaktion einen Einfluss auf die Lokalisation der Proteine ausübt.

Als nukleär-zytoplasmatisches *shuttle*-Protein ist BRCA1 in der Lage, adäquat auf Zellschäden zu reagieren, indem es im Zellkern die Reparatur von beschädigter DNA initiiert. Da es sich bei BRCA1 um ein relativ großes Protein handelt (220 kDa) handelt, kann der hierfür notwendige nukleäre Import nur über aktiven Transport durch Bindung eines anderen Proteins (im Normalfall Importin α/β oder BARD1) erfolgen (Thompson M., 2010).

Um einen Zustand zu simulieren, welcher eine Lokalisationsänderung von BRCA1 hervorruft, wurden mit MLH1-ITGA9, MLH1 Δ und Wildtyp MLH1 transient transfizierte HEK293T mit 30 μ M Etoposid behandelt. Nach 48 Stunden erfolgte analog den Lokalisationsstudien die Markierung der exogenen (MLH1-ITGA9, MLH1 Δ und Wildtyp MLH1) bzw. endogenen (BRCA1) Proteine mit MLH1- und BRCA1-Primärantikörpern, welche anschließend aufgrund der Zweitantikörper (MLH1: anti-rabbit-FITC und BRCA1: anti-mouse-PE) fluoreszenzmikroskopisch unterschieden werden konnten. Verglichen wurden die Lokalisationen der Proteine mit und ohne Etoposidbehandlung; der Zellkern wurde auch hier mittels DAPI gegengefärbt.

Betrachtet man unbehandelte Zellen, die rekonstituierten Wildtyp exprimieren, erkennt man einerseits die nukleären Wildtyp MLH1-Proteine sowie BRCA1, welches sich sowohl im Kern als auch im Zytoplasma aufhält. Bei einer Stimulierung mit 30 μ M Etoposid konzentriert sich BRCA1 wie erwartet im Zellkern. In Zellen jedoch, welche das Fusionsprotein MLH1-ITGA9 bzw. MLH1 Δ exprimieren, bleibt nach Etoposidstimulierung diese Akkumulation von BRCA1 im Zellkern aus. Diese zytoplasmatische Retention könnte auf einen pathomolekularen Mechanismus verursacht durch das Fusionsprotein bzw. dessen trankierte Variante hinweisen, welche mit einem Funktionsverlust des Wildtyp BRCA1 einhergeht.

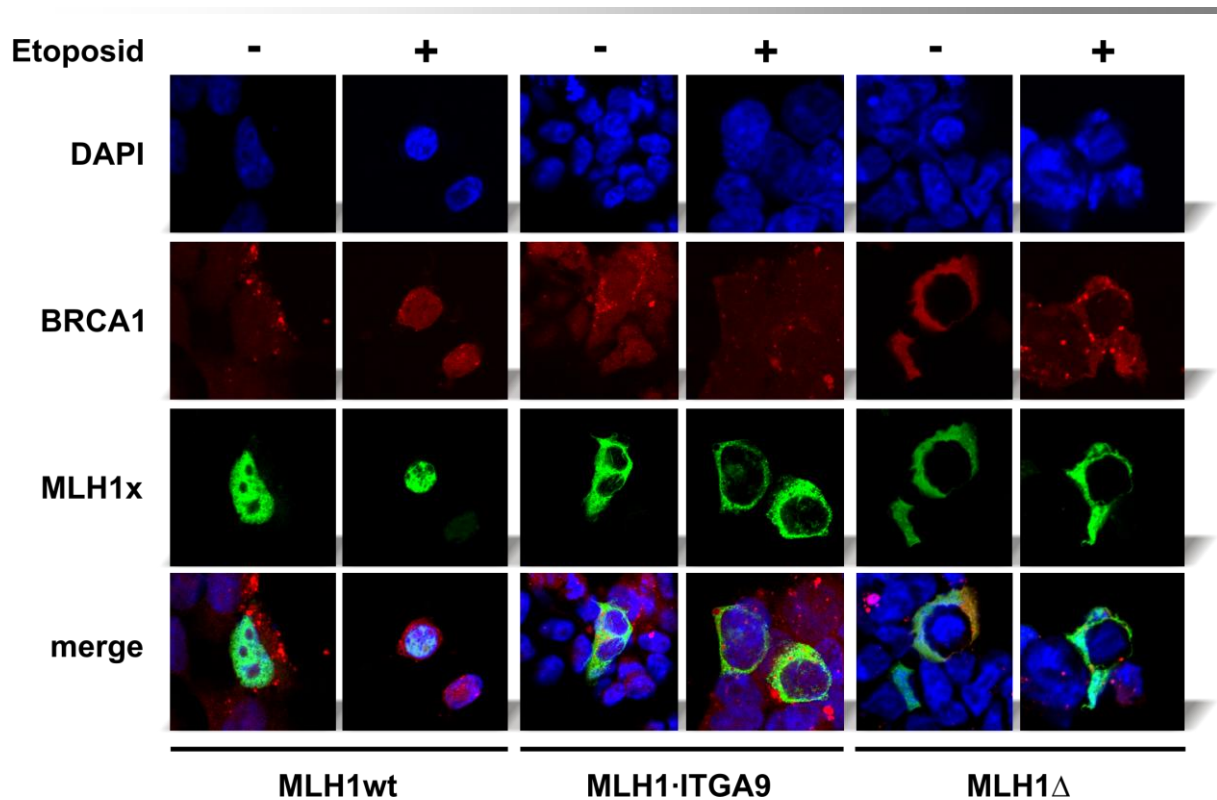


Abbildung 4-20: Immunohistochemische Lokalisationsanalyse von endogenem BRCA1 unter Einfluss von Wildtyp MLH1, MLH1-ITGA9 oder MLH1Δ nach Stimulierung mit 30 μM Etoposid.

4.7 Einfluss auf DNA-Reparatur-Signalwege

Die Konsequenzen der beobachteten zytoplasmatischen Retention von BRCA1 wurden anschließend auf funktioneller Ebene analysiert. Sollte tatsächlich ein Funktionsverlust des BRCA1-Proteins für die Tumorgenese verantwortlich sein, müsste sich dies auch auf andere Proteine auswirken und sowohl auf transkriptioneller als auch auf Proteinebene widerspiegeln.

Als eines der wichtigsten Proteine, welches für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität verantwortlich ist, reguliert BRCA1 im Falle von DNA-Schäden eine Vielzahl weiterer Proteine. Je nach Ausmaß des Schadens resultieren daraus beispielsweise Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur oder Apoptose.

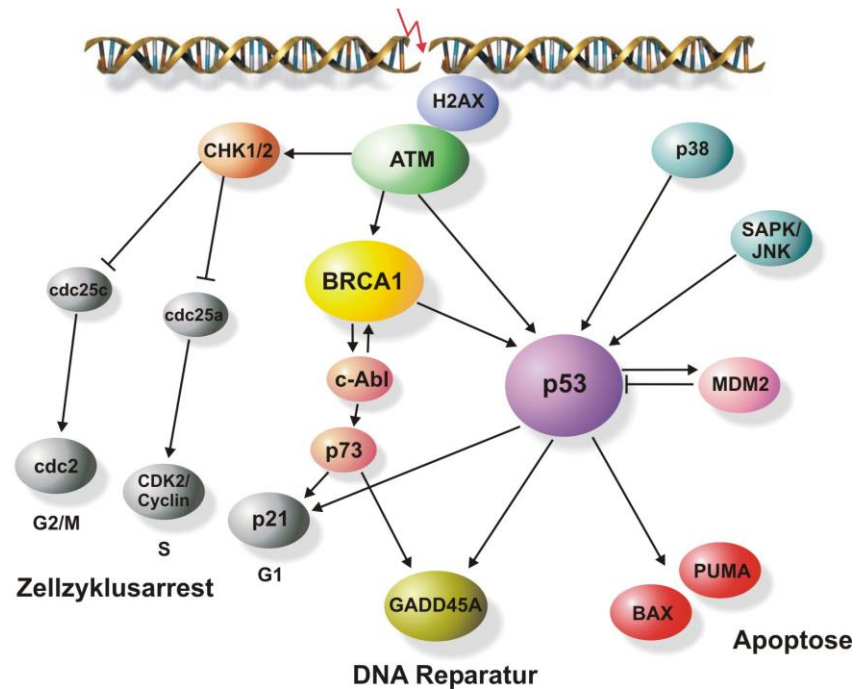


Abbildung 4-21: DNA-Reparatur-Signalwege. Bei Auftreten von Doppelstrangbrüchen kumuliert Ser139-phosphoryliertes Histon H2A.X in subnukleären Foci. Dadurch werden die Kinasen ATM/ATR aktiviert, welche wiederum Chk1 (ATR) bzw. Chk2 (ATM) aktivieren. Diese phosphorylieren und inaktivieren cdc25, verhindern die Aktivierung von cdc2/CDK2 und arretieren die Zelle in G₂/M bzw. S-Phase. Durch Phosphorylierung an Ser15 von p53 wird p21 hochreguliert; zusätzlich können der SAPK/JNK und der p38 MAPK Signalweg ebenfalls über Aktivierung von p53 G₂/M-Arrest hervorrufen. ATM phosphoryliert auch BRCA1 und c-Abl; dieses wiederum aktiviert p73, welches weitere Zellzyklus- und Apoptoseproteine transkriptionell reguliert. Weitere targets von p53 sind die beiden pro-apoptotischen Proteine BAX und PUMA.

Auf transkriptioneller Ebene wurden der CDK-Inhibitor p21, GADD_{45A} (*growth arrest and DNA-damage inducible, alpha*), p63 und p73 sowie die beiden pro-apoptotischen Proteine BAX (*Bcl2-associated-X protein*) und PUMA (*p53 up-regulated modulator of apoptosis*) mittels quantitativer *Realtime-PCR* untersucht. Bei DNA-Schäden reagiert p21 mit einem Zellzyklusarrest in der G₁-Phase während GADD₄₅ über p38 und den JNK-Signalweg den Zellzyklus in G₂/M arretiert (Zhu N. *et al.*, 2009).

Ergebnisse

HEK293T-Zellen, welche Wildtyp-MLH1, MLH1-ITGA9 oder MLH1 Δ exprimierten, wurden für 24 Stunden mit 30 μ M Etoposid stimuliert. 48 Stunden nach der Transfektion wurde deren RNA isoliert und revers in cDNA transkribiert. Diese cDNA wurde anschließend als Template zur Durchführung der quantitativen *Realtime*-PCR verwendet. Als interner Standard zur relativen Quantifizierung der zu untersuchenden Gene diente Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode.

Zur Kontrolle der Expression wurde die Anwesenheit der Transkripte zuvor mittels Reverse-Transkriptase-PCR überprüft.

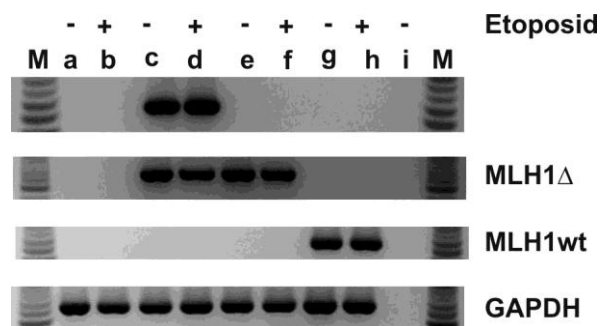


Abbildung 4-22: Reverse Transkriptase-PCR zur Überprüfung der Transkripte. a, b = 293T; c, d = MLH1-ITGA9; e, f = MLH1 Δ ; g, h = MLH1 Δ ; i = Wasserkontrolle.

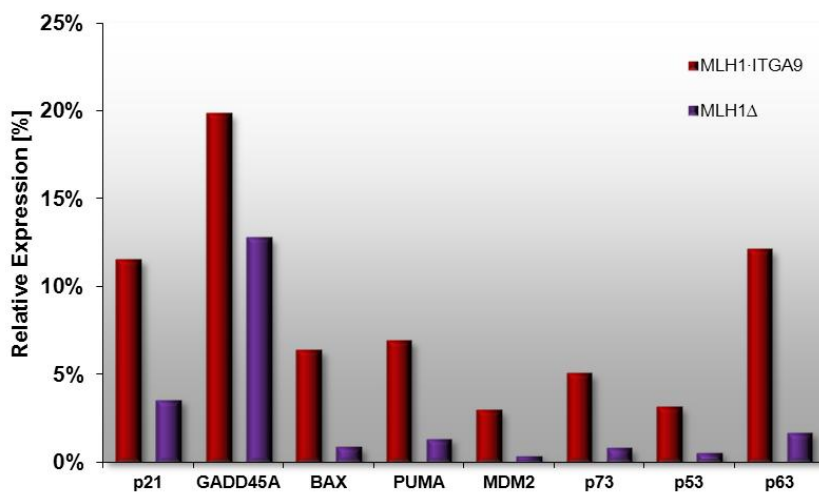


Abbildung 4-23: Relative Expression unterschiedlicher Gene nach Etoposidbehandlung in MLH1-ITGA9- bzw. MLH1 Δ -transfizierten HEK293T-Zellen.

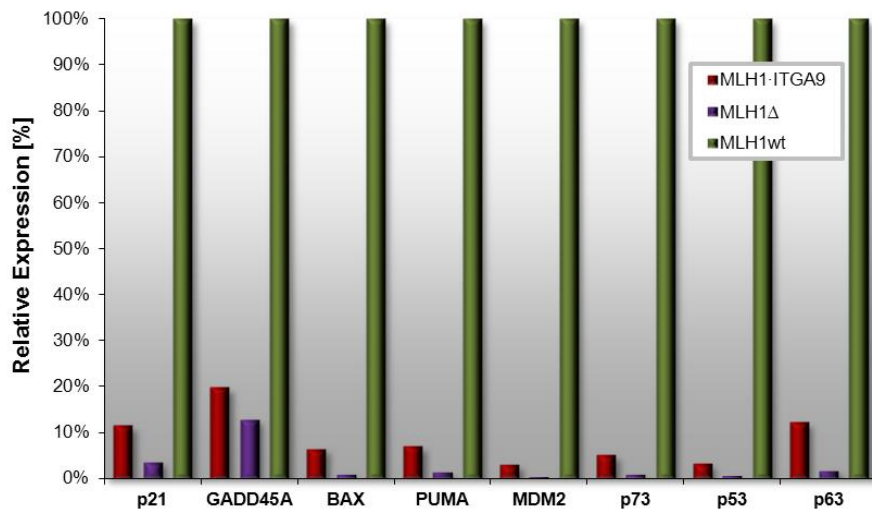


Abbildung 4-24: Relative Expression unterschiedlicher Gene nach Etoposidbehandlung in MLH1-ITGA9- bzw. MLH1Δ-transfizierten HEK293T-Zellen verglichen mit Zellen mit rekonstituiertem Wildtyp MLH1 (= 100%).

HEK293T-Zellen, die MLH1-ITGA9 oder MLH1Δ exprimierten, zeigten signifikant niedrigere Expressionslevel von allen untersuchten Genen nach Etoposidstimulierung. Dieser Effekt wird besonders deutlich, wenn man die Werte in Relation zu den Expressionsleveln der rekonstituierten HEK293T-Zellen setzt, wobei die transkripte Variante MLH1Δ diesen Effekt noch stärker auszuüben vermag als das Fusionsprotein.

Um zu überprüfen, ob sich diese Ergebnisse auch auf Proteinebene widerspiegeln, wurden gleichermaßen behandelte Zellen über Western Blot auf ihren p53- sowie phospho-p53 (Serin 15) Gehalt analysiert.

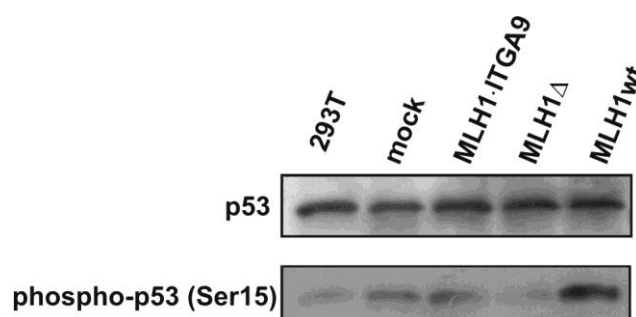


Abbildung 4-25: Western Blot-Analyse von p53 und phosphoryliertem p53 (Serin 15) in Etoposid-behandelten HEK293T-Zellen.

Ergebnisse

Auch auf Proteinebene zeigte sich in Wildtyp-MLH1 rekonstituierten Zellen der größte Gehalt an aktiviertem p53, während dieser in Zellen mit dem Fusionsprotein etwas geringer und in Zellen, welche MLH1 Δ exprimierten, am geringsten ausfiel.

Abschließend sollte untersucht werden, ob das Fusionsprotein bzw. MLH1 Δ in der Lage ist, weitere Proteine neben p53 zu deregulieren. Zu diesem Zweck wurden stabile Zelllinien (MEF/tTA; Clontech) generiert, in denen MLH1-ITGA9, MLH1 Δ oder Wildtyp-MLH1 unter Kontrolle eines Tetracyclin-regulierbaren Promotors exprimiert werden (tet-Off). Die Zellen wurden ebenfalls mit 30 μ M Etoposid für 24 Stunden behandelt und weitere 24 Stunden später mit spezifischen Antikörpern gegen die phosphorylierten Formen von Histon H2A.X (Ser139), Chk1 (Ser345), Chk2 (Thr68), p53 (Ser15), cdc2 (Tyr15), p38 MAPK (Thr180/Tyr182) sowie SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) inkubiert. Da p21 der transkriptionellen Regulierung durch p53 unterliegt, wurde hier Gesamt-p21 detektiert. Nach drei Waschschrritten wurden die Zellen mit Fluorochrom-konjugiertem Zweitantikörper inkubiert und die Relative Fluoreszenzintensität bestimmt.

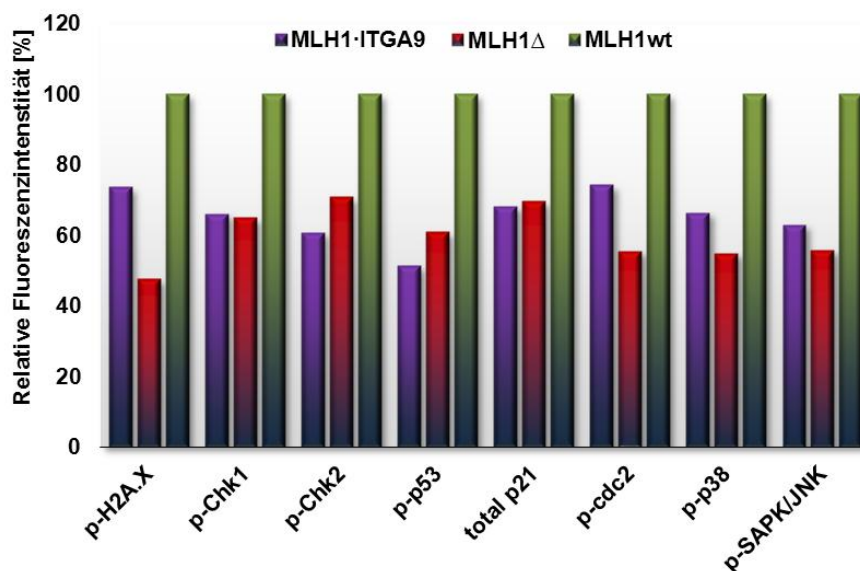


Abbildung 4-26: Relative Fluoreszenzintensitäten phosphorylierter DNA-Reparaturproteine in stabil transfizierten MEF/tTA-Zellen.

Ergebnisse

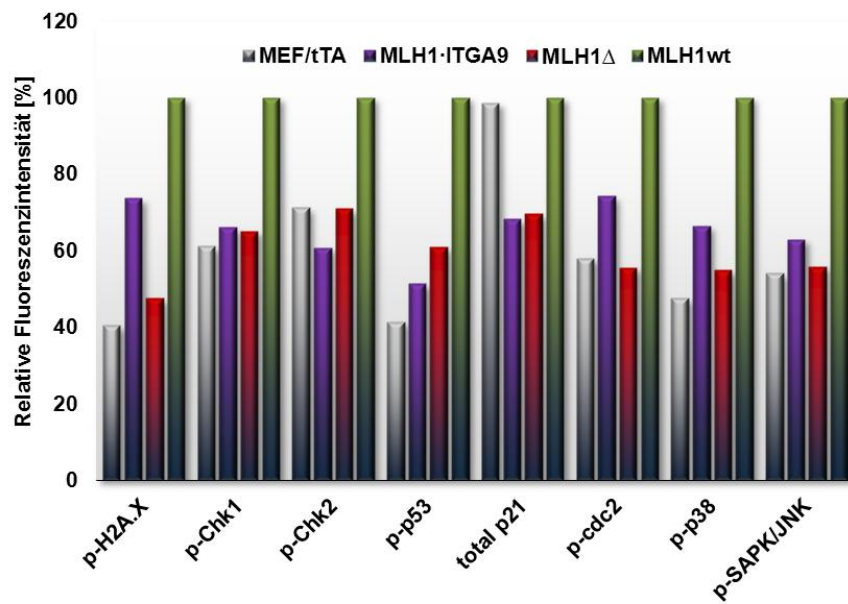


Abbildung 4-27: Relative Fluoreszenzintensitäten phosphorylierter DNA-Reparaturproteine in stabil transfizierten MEF/tTA-Zellen. Relative Quantifizierung erfolgte gegen Wildtyp-MLH1 exprimierende Zellen (= 100%).

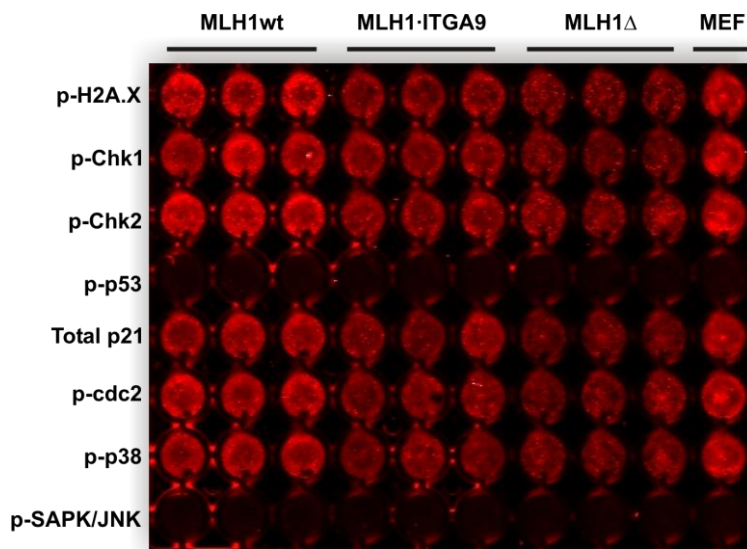


Abbildung 4-28: Immunohistochemische Analyse unterschiedlicher phosphorylierter Proteine in stabil transfizierten MEF/tTA-Zellen, die entweder Wildtyp-MLH1, MLH1-ITGA9 oder MLH1Δ exprimieren. (p-p53 und p-SAPK/JNK-Antikörper stammten aus einer unterschiedlichen Wirtsspezies (Maus), die hier nicht darstellbar waren.)

Aus den relativen Fluoreszenzintensitäten lässt sich ableiten, dass sowohl das Fusionsprotein MLH1-ITGA9 als auch in stärkerem Ausmaß MLH1 Δ in der Lage ist, den Phosphorylierungsstatus wichtiger DNA-Reparaturproteine zu beeinflussen. Da diese Proteine sowohl *up-* als auch *downstream* von p53 ihre Funktionen ausüben, weist dies darauf hin, dass MLH1-ITGA9 und MLH1 Δ bereits recht früh in die DNA-Reparatur-Signalkaskade eingreifen.

4.8 Apoptoseassay

Ein Merkmal von Krebszellen ist neben einer verstärkten Zellproliferation eine erhöhte Apoptoseresistenz, ausgelöst entweder durch Aktivierung von Onkogenen und/oder der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen.

Da das Fusionsprotein MLH1-ITGA9 lediglich in Tumorgewebe, nicht aber in normalen Zellen gefunden wurde, liegt die Vermutung nahe, dass es im Stande ist, als Onkogen zu fungieren oder als solches die Funktion von Tumorsuppressorgenen zu beeinflussen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass MLH1-ITGA9 und MLH1 Δ in der Lage sind, sowohl auf transkriptioneller als auch auf Phosphorylierungsebene wichtige Proteine des DNA-Reparatursignalweges zu deregulieren. Eine solche Deregulation sollte zur Folge haben, dass Zellen nicht mehr befähigt sind, adäquat durch Zellzyklusarrest, Initiation von DNA-Reparaturmechanismen oder Apoptose auf Schädigungen der Zelle zu reagieren.

Um den Einfluss auf das Zellüberleben zu überprüfen, wurden HEK293T-Zellen mit MLH1-ITGA9::EGFP sowie MLH1 Δ ITGA9::EGFP transfiziert, mit 30 μ M Etoposid behandelt und anschließend mit Propidiumiodid gefärbt. Als Negativkontrollen dienten untransfizierte HEK293T-Zellen sowie mit Leervektor (pcDNA3.1(-)-EGFP) transfizierte Zellen. Verglichen wurde die Apoptoserate außerdem mit Zellen, welche durch Transfektion mit MLH1wt::EGFP rekonstituiert wurden. Der Anteil an EGFP- sowie Propidiumiodid-positiven Zellen wurde nach 24 Stunden durchflusszytometrisch bestimmt.

Ergebnisse

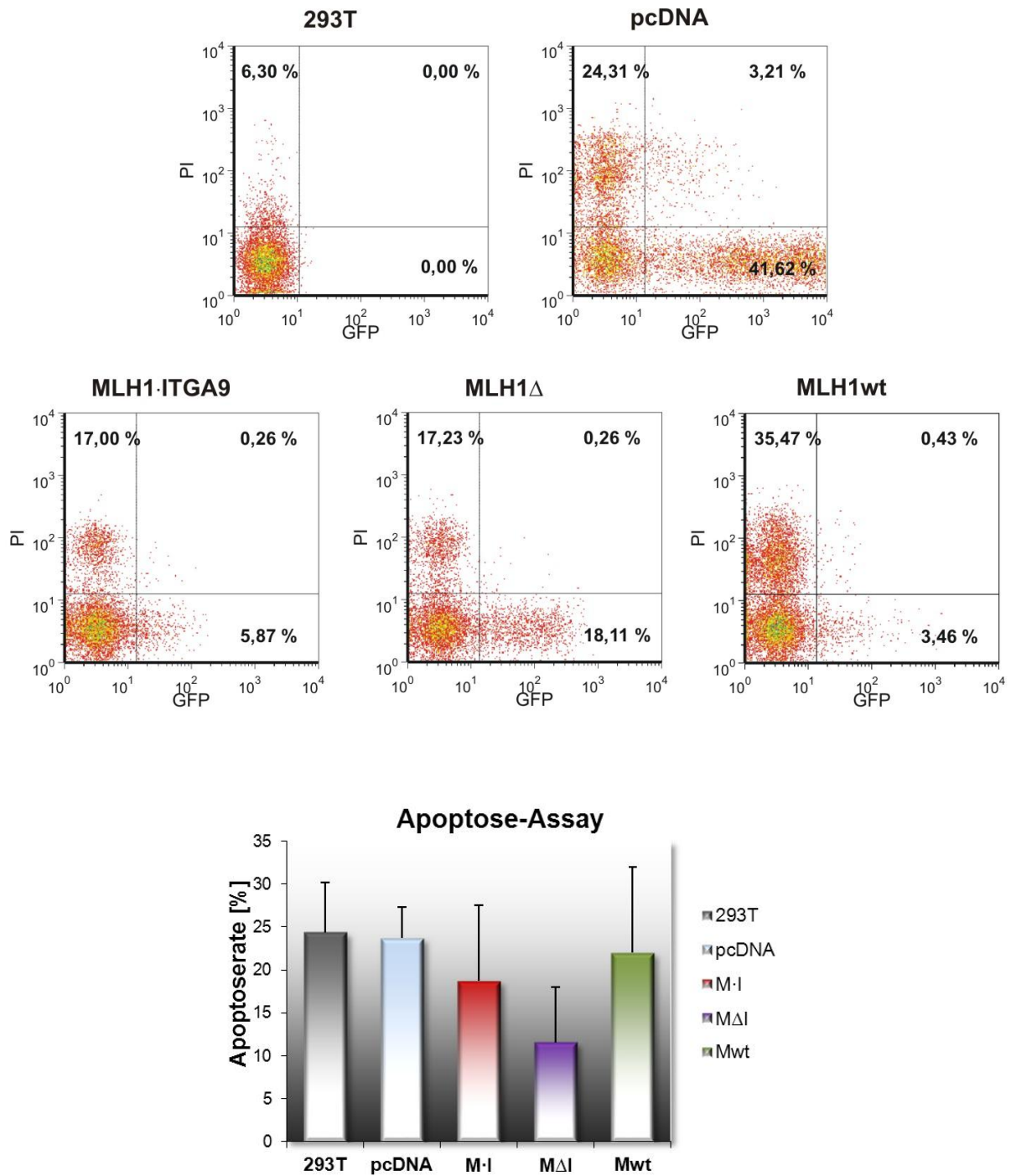


Abbildung 4-29: Apoptoseassay. Verglichen wurde die Apoptoserate von Zellen, die untransfiziert (293T), mit Leervektor (pcDNA), Fusionsprotein MLH1-ITGA9 (M-I), trankierter Variante MLH1 Δ (M Δ I) oder Wildtyp MLH1 (Mwt) transfiziert wurden. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte nach 24 Stunden

Sowohl die Zellen, welche das Fusionsprotein MLH1-ITGA9 als auch die trankierte Variante MLH1 Δ exprimierten, zeigten im Vergleich zu den Negativkontrollen bzw. zu Zellen mit rekonstituiertem Wildtyp MLH1 eine verringerte Apoptoserate, wobei die Apoptoseresistenz vor allem bei den Zellen erhöht war, welche die trankierte Variante der Fusion bzw. des Wildtypproteins exprimierten.

4.9 Focus Formation Assay

Um das onkogene Potential des Fusionsproteins zu testen, wurde ein *Focus Formation Assay* (Koloniebildungsassay) durchgeführt. Diesem Assay liegt die Annahme zugrunde, dass potentielle Onkogene in der Lage sein sollten, Fibroblasten insoweit zu transformieren, dass es zu einem Verlust der Kontaktinhibition kommt. *In vitro* zeigt sich in nicht-transformierten Zellen diese Kontaktinhibition durch einen Wachstumsstopp bei Erreichen einer zelltypspezifischen Sättigungsdichte. Bleibt dieser Wachstumsstopp aus, beispielsweise durch eine gesteigerte Proliferationsrate oder gestörte physiologische Wachstumshemmung, bilden die Zellen mehrschichtige Zellhäufchen, die als sogenannte „foci“ erkennbar sind.

Der Assay wurde mit stabil transfizierten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF/tTA; *Clontech*) durchgeführt, welche das Fusionsprotein MLH1-ITGA9 oder nur deren N- (MLH1 Δ) bzw. C-Terminus (Δ ITGA9) unter der Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren Promotor-systems exprimieren (*Tet-Off*). Als Positivkontrolle dienten murine Fibroblasten, welche onkogenes H-ras exprimieren und als Negativkontrolle untransfizierte murine Fibroblasten. Das Zellwachstum wurde jeweils unter An- und Abwesenheit von Doxycyclin für 2 bzw. 3 Wochen beobachtet.

Sowohl nach 2 als auch nach 3 Wochen zeigt sich deutlich das onkogene Potential von H-ras durch Bildung eindeutig abgrenzbarer Foci, während die Negativkontrolle stets zu einem homogenen Zellrasen gewachsen war. Entgegen der Erwartungen, welche sich aus vorigen Experimenten ableiteten, konnte weder in MLH1-ITGA9- noch in MLH1 Δ - oder Δ ITGA9-exprimierenden Zellen ein Verlust der Kontaktinhibition beobachtet werden.

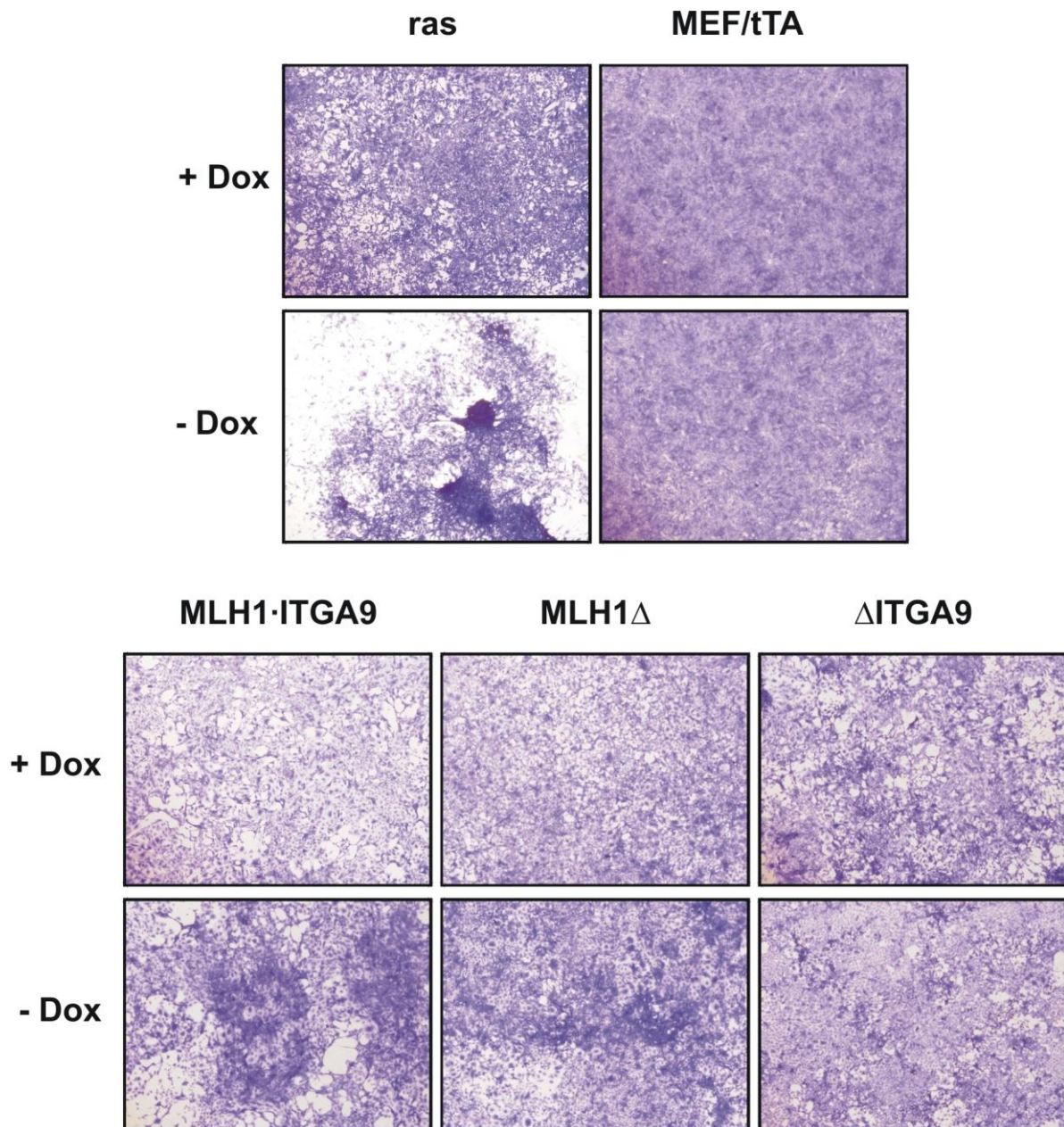


Abbildung 4-30: Focus Formation Assay mit murinen embryonalen Fibroblasten (MEF/tTA). Beobachtet wurden Zellen unter An- und Abwesenheit von Doxycyclin über einen Zeitraum von 2 Wochen. Eine eindeutige Focibildung ist nur in der Positivkontrolle (ras) zu erkennen, während die Negativkontrolle (MEF/tTA) sowie MLH1-ITGA9 bzw. MLH1 Δ / Δ ITGA9 keinen Verlust der Kontaktinhibition aufwiesen. Die Anfärbung der Zellen erfolgte mit Kristallviolett.

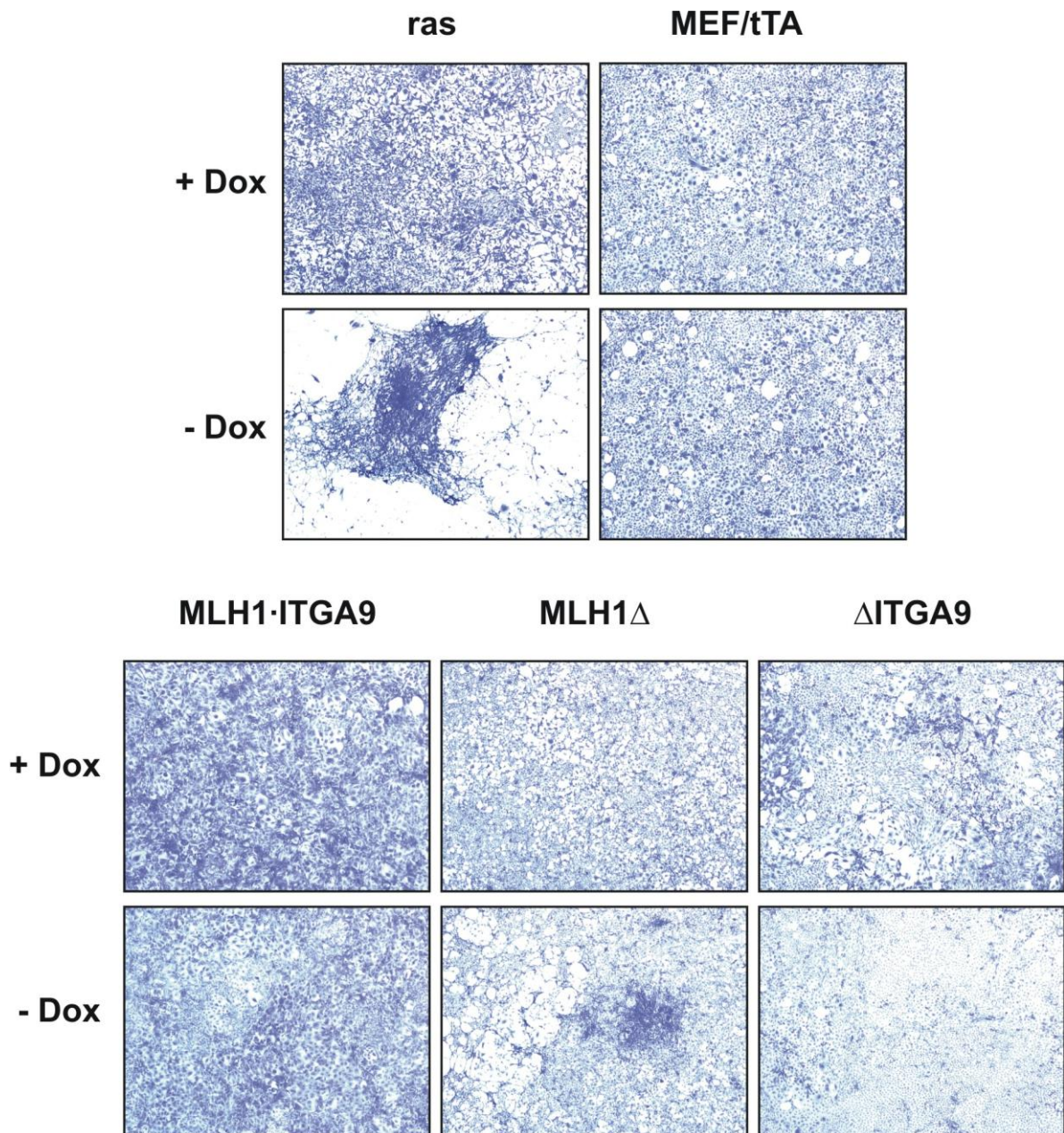


Abbildung 4-31: Focus Formation Assay mit murinen embryonalen Fibroblasten (MEF/tTA). Beobachtet wurden Zellen unter An- und Abwesenheit von Doxycyclin über einen Zeitraum von 3 Wochen. Eine eindeutige Focibildung ist nur in der Positivkontrolle (ras) zu erkennen, während die Negativkontrolle (MEF/tTA) sowie MLH1·ITGA9 bzw. MLH1 Δ / Δ ITGA9 keinen Verlust der Kontaktinhibition aufwiesen. Die Anfärbung der Zellen erfolgte mit Bromphenolblau.

4.10 Zelladhäsionsassay

Auch wenn über Co-Immunpräzipitation keine Interaktion zwischen Proteinen der Fokalen Adhäsion mit dem Fusionsprotein nachgewiesen werden konnte, sollte in funktionellen Assays überprüft werden, ob MLH1-ITGA9 noch in der Lage ist, Einfluss auf Zellbewegung und –adhäsion auszuüben.

Hierzu wurde eine 96-*well*-Platte mit *in vitro* produzierter Extrazellulärer Matrix (MaxGel™ ECM; Sigma) bei 37°C für eine Stunde beschichtet, zweimal gewaschen (0,1% BSA in DMEM) und anschließend mit 0,5% BSA in DMEM blockiert. Nachdem einmal mit Waschpuffer gewaschen wurde, wurden 50 µl Zellsuspension ($4 \cdot 10^5$ Zellen/ml) in jedes *well* gegeben und erneut im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ für eine halbe Stunde inkubiert. Durch den nachfolgenden Zentrifugationsschritt (2000 rpm für 10-15 Sekunden) sollten nur die aggregierten Zellpartikel auf der Matrix verbleiben, während nicht aggregierte Zellen in den nachfolgenden Waschschrritten verloren gingen. Aggregierte Zellen wurden mit 4% Paraformaldehydlösung fixiert, kurz gewaschen, mit Kristallviolett gefärbt und getrocknet. Anschließend wurden die Kristalle durch eine 2-prozentige SDS-Lösung für 30 min gelöst. Die optische Dichte der adhärennten Zellen wurde bei 550nm gemessen.

Es wurden fünf unterschiedliche adhärennte Zelllinien für diesen Assay verwendet, welche das Fusionsprotein MLH1-ITGA9 nach Lipofektion exprimierten (HEK293T, HeLa, Sk-HEP, U2-OS und HCT-116). Da es sich bei dem transfizierten Vektor um pcDNA3.1(-)-MLH1-ITGA9-EGFP handelt, konnte die Transfektionseffizienz über die Fluoreszenz überprüft werden. Bei keiner der untersuchten Zelllinien konnte allerdings eine Veränderung bezüglich der Zelladhäsion verglichen mit Leervektor-transfizierten Zellen beobachtet werden.

Zelladhäsionsassay

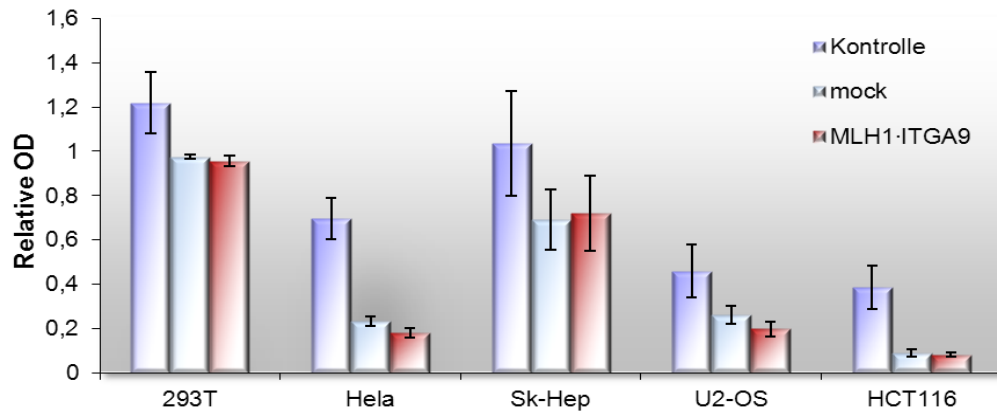


Abbildung 4-32: Zelladhäsionsassay mit unterschiedlichen Zelllinien. Die Zellen waren entweder unbehandelt (Kontrolle) oder mit Leervektor (mock; pcDNA3.1(-)-EGFP) bzw. Fusionsprotein MLH1-ITGA9::EGFP transfiziert.

4.11 Zellmigrationsassay

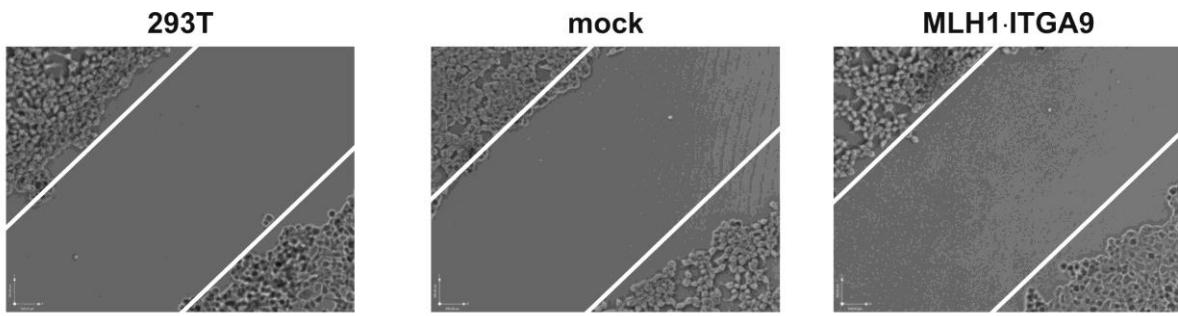
Da in mehreren Publikationen beschrieben wurde, dass alleine der cytoplasmatische Teil des Integrin α_9 nach Interaktion mit bestimmten Signalproteinen ausreichend ist, eine verstärkte Zellmigration hervorzurufen, sollte überprüft werden, ob dies auch auf das Fusionsprotein MLH1-ITGA α_9 zutrifft.

Hierzu wurde MLH1-ITGA α_9 ::EGFP mittels Lipofektion in HEK293T-Zellen eingebracht und die Zellen so ausgesät, dass nach 24 Stunden eine rund 90%ige Konfluenz zu beobachten war. Mit Hilfe einer Pipettenspitze wurde eine künstliche „Wunde“ erzeugt und anschließend das Bestreben der Zellen pro Zeit beobachtet, die erzeugte Lücke wieder zu schließen.

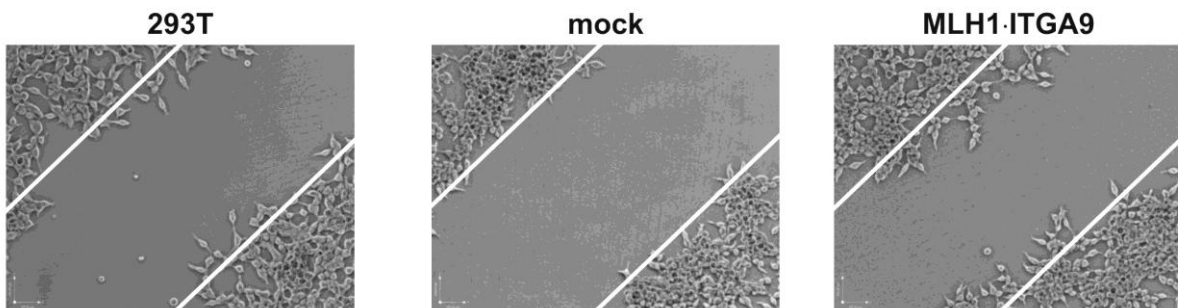
Das Ausmaß migrierter Zellen wurde durch Auszählen bestimmt und mit dem Migrationsbestreben von untransfizierten (293T) sowie mit Leervektor (pcDNA3.1(-)-EGFP) transfizierten Zellen verglichen.

Auch hier konnte kein signifikanter Einfluss auf das Zellmigrationsverhalten transfizierter Zellen beobachtet werden. Daher ist davon auszugehen, dass das Fusionsprotein nicht mehr in der Lage ist, auch nur teilweise über den C-Terminus Funktionen des Wildtyp-Proteins Integrin α_9 auszuüben.

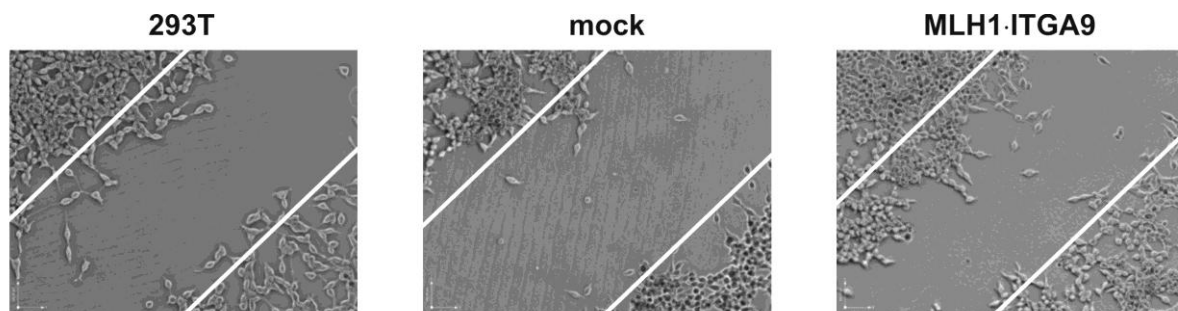
Ergebnisse



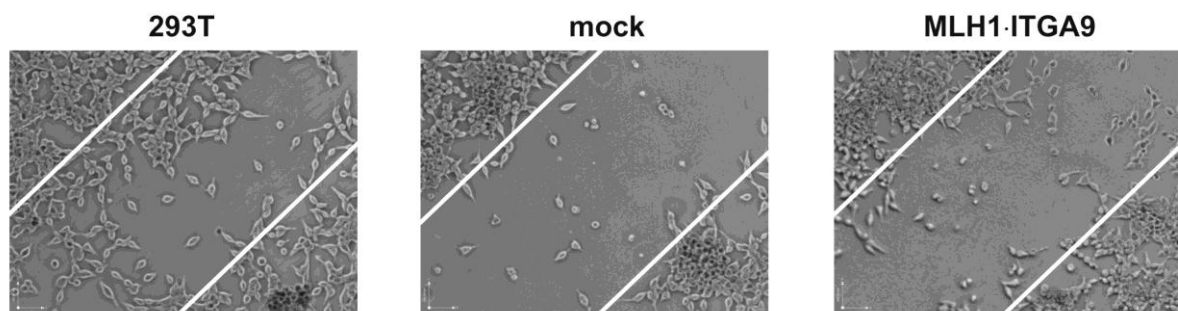
24 Stunden nach der Transfektion



36 Stunden nach der Transfektion



48 Stunden nach der Transfektion



72 Stunden nach der Transfektion

Zellmigrationsassay

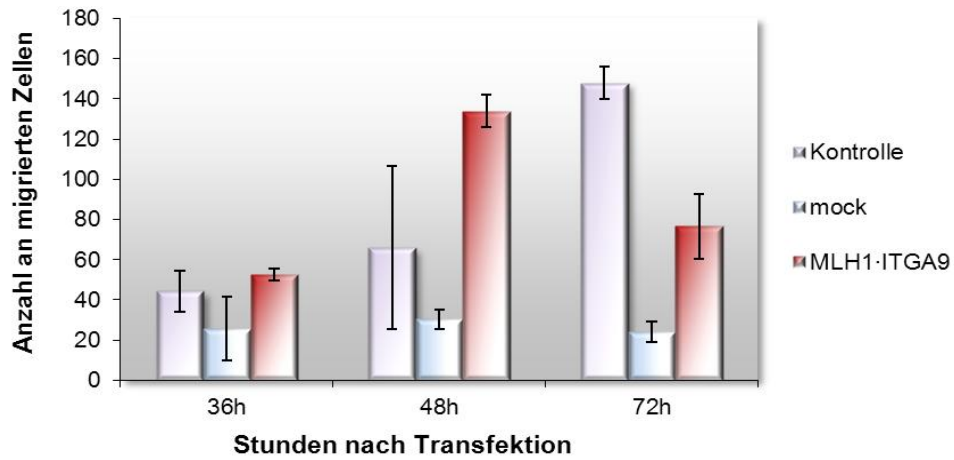


Abbildung 4-33: Zellmigrationsassay. Ausgewertet wurde die Anzahl an unbehandelten (Kontrolle), Leervektor- (mock; pcDNA_{3.1}(-)-EGFP) bzw. MLH1-ITGA₉::EGFP transfizierten migrierten HEK293T-Zellen nach 36, 48 bzw. 72 Stunden.

5 Diskussion

Dickdarmkrebs zählt mit 16% zu den zweithäufigsten bösartigen Erkrankungen nach Lungenkrebs sowie mit 12-14% zu der zweithäufigsten Krebstodesursache in Deutschland. Mit einer Prävalenz von 3-5% aller Kolorektalkarzinome ist das Lynch-Syndrom die häufigste Disposition.

Das Lynch-Syndrom geht mit Tumoren des Dickdarmes oder auch anderer Organe - wie der Gebärmutterschleimhaut - einher und tritt bei Anlageträgern im Vergleich zu sporadischen Kolorektalkarzinomen bereits in jüngeren Jahren auf. Desweiteren ist es durch eine beschleunigte Karzinogenese, aber auch einer höheren Überlebensrate charakterisiert (Stigliano V. *et al.*, 2008). Die Ursachen des Lynch-Syndromes sind auf molekularbiologischer Ebene auf einen Defekt der Basenfehlpaarungsreparatur (Basen-*Mismatch*-Reparatursystem) zurückzuführen. Dabei können alle relevanten Reparaturgene von Mutationen betroffen sein; überwiegend sind dies allerdings die Gene *MSH2* und *MLH1*.

Das Fusionsprotein *MLH1-ITGA9* wurde im Jahr 2009 publiziert, nachdem es bei einer Lynch-Syndrom-Familie aus Französisch-Guyana gehäuft identifiziert wurde. Zahlreiche Familienmitglieder waren an unterschiedlichen Krebsarten erkrankt, welche allerdings teilweise nicht in Einklang mit dem typischen Spektrum der durch Lynch-Syndrom verursachten extrakolonischen Tumore waren. Dies hatte zur Hypothese geführt, dass das neu entdeckte Fusionsprotein *MLH1-ITGA9* eine ursächliche Rolle für die Pathogenese dieser Tumore spielt.

5.1 Entstehung des Fusionsproteins

MLH1-ITGA9 ist das erste Fusionsprotein, welches in einem pathologischen Zusammenhang identifiziert wurde (Meyer C. *et al.*, 2009). Erst zwei Jahre später wurden zwei weitere Fusionen des *MLH1*-Gens bei Lynch-Syndrom-Patienten publiziert.

Im ersten Fall handelt es sich um zwei Fusionstranskripte der Gene MLH1 und LRRFIP2, welche durch parazentrische Inversion auf Chromosom 3p22.2 entstanden waren. Die Folge waren einerseits eine Fusion der Exons 1-15 des MLH1-Gens mit Exon 29 des LRRFIP2-Gens sowie der Exons 1-3 von LRRFIP2 mit Exon 16-19 von MLH1 (Morak M. *et al.*, 2011). Im zweiten Fall wurde ein exonisches Rearrangement zwischen den Exons der Gene MLH1 und ebenfalls LRRFIP2 identifiziert, welche eine Deletion der Exons 17-19 des MLH1-Gens bzw. 26-29 des LRRFIP2-Gens zur Folge hatte (Pinheiro M. *et al.*, 2011). In beiden Fällen wurde allerdings davon ausgegangen, dass die Deletion der restlichen Exons zu einem vollständigen Funktionsverlust beider Wildtypproteine führt und dass allein der Verlust der Exons des MLH1-Gens für die Entstehung des Lynchsyndroms ausreichend war.

Im Falle des Fusionsproteins MLH1-ITGA9 sind jedoch durch die Größe der interstitiellen Deletion (400 kb) neben LRRFIP2 auch die beiden Gene GOLGA4 und APRG1 sowie ein Teil des Integrins $\alpha 9$ betroffen, so dass man nicht nur von einem *Gain-of-Function* des Fusionsproteins, sondern auch einem *Loss-of-Function* der drei dazwischenliegenden Gene LRRFIP2, GOLGA4 und APRG1 ausgehen müsste. Dieser Funktionsverlust der drei Gene lässt sich experimentell allerdings schwer darstellen, da einerseits kein Originaltumorgewebe zur Verfügung stand, und andererseits zur Etablierung eines authentischen Testsystems neben einem *Knock-in* des Fusionsproteins auch das Ausschalten der drei Gene nötig wäre. Für eine vollständige Aufklärung des Pathomechanismus wäre eine Untersuchung der Auswirkung der Funktionsverluste dieser drei Gene aber unerlässlich.

Desweiteren befindet sich die Deletion in einer Region, welche sich in epithelialen Tumoren oft als mutiert erwiesen hat. Speziell Chromosomenlokus 3p21 ist zu 50-100% in mehr als 30 unterschiedlichen Tumorarten rearrangiert, darunter Lungen-, Brust-, Eierstock- und Dickdarmtumoren (Braga E. *et al.*, 2011). Tatsächlich wurden mittlerweile mehrere Gene in dieser Region als Tumorsuppressorgene bestätigt (Angeloni D. 2007). Aufgrund dieses Phänomens wird vermutet, dass die hier betroffene Region ebenfalls mehrere Tumorsuppressorgene beinhaltet, deren Deletion auch in diesem Fall zur Entstehung der Tumoren beigetragen haben könnte.

5.2 Identifizierung von MLH1·ITGA9-Interaktionspartnern

Obwohl es möglich war, über das *Strep*-Tactin-System eine saubere Aufreinigung des Proteins zu erreichen, konnten weder über anschließende Western-Blot-Analyse noch über massenspektrometrische Untersuchungsmethoden potentielle Interaktionspartner identifiziert werden. Dies kann rein methodische Ursachen gehabt haben, beispielsweise zu stringentes Waschen, nicht ausreichend lange Inkubationszeit für spezifische Bindung der Antikörper an die Proteine oder unspezifische Bindungen an die *Strep*-Tactin-Matrices sowie unzureichende Elution von den Matrices.

Wie den MS-Läufen zu entnehmen ist, waren vor allem Hitzeschockproteine oder Proteine des Zytoskelettes mit dem Fusionsprotein assoziiert. Hitzeschockproteine sind ubiquitäre, hoch konservierte Chaperone, welche für die Aufrechterhaltung der funktionellen Konformation von Proteinen, aber auch für den Schutz der Proteine vor Denaturierung in zellulären Stresssituationen verantwortlich ist. Daher ist deren Auffinden nicht überraschend; eine zu große Menge daran kann aber die Detektion von interessanten aber nur in geringen Mengen in der Zelle vorkommenden Proteinen in der LC-MALDI-TOF/TOF-Analyse unterdrücken oder erschweren. Da vermutet wurde, dass das Fusionsprotein in der Lage ist, über die noch vorhandenen hydrophoben Transmembrandomänen im ITGA9-Teil gegenseitig zu einer Art Mizellen zu assoziieren, und damit einige Modifikationen bezüglich der massenspektrometrischen Analyse erfordert hätte (beispielsweise der Einsatz eines stärkeren Elutionsmittels in der Flüssigchromatographie, wurde als erstes versucht, diese Transmembrandomäne aus dem Gen zu entfernen. Die MS-Analyse des daraus translatierten Proteins ergab allerdings keine Unterschiede zu vorausgegangenen MS-Läufen.

Auch der Einsatz von Crosslinkern, sowohl Paraformaldehyd als auch BS₃ oder DTBP, förderte keine neuen Interaktionspartner zutage. Daher konnte nicht gezeigt werden, dass das Fusionsprotein in der Lage ist, mit anderen Proteinen Wechselwirkungen einzugehen, welche über einen transienten Zustand hinausgehen und über eine ausreichende Stabilität verfügen, um massenspektrometrisch erfasst zu werden.

Eine weitere Möglichkeit, weshalb keine bereits bekannten Interaktionspartner der Wildtypproteine gefunden werden konnten, könnte eine Konformationsänderung des Fusionsproteins und damit einhergehende veränderte Proteinfaltung sein, welche eine Bindung an andere Proteine unmöglich macht.

5.3 Die Interaktion von MLH1-ITGA9 mit BRCA1

Im Gegensatz zu den massenspektrometrischen Analysen konnte über Immunopräzipitation und anschließende Western-Blot-Analyse die Interaktion zwischen dem Fusionsprotein sowie dessen trankierte Variante MLH1 Δ mit BRCA1 gezeigt werden.

BRCA1 wurde gemeinsam mit MLH1 in einem Multiproteinkomplex namens BASC (*BRCA1 associated genome surveillance complex*) gefunden, welcher zahlreiche Tumorsuppressoren sowie DNA-Reparaturproteine enthält. Diese Proteine waren neben MLH1 MSH2, MSH6, ATM und BLM der RAD50-MRE11-NBS1-Komplex sowie RFC (*DNA replication factor C*) (Wang Y. *et al.*, 2000). In diesem Komplex konnte Wang zwar beide Proteine über massenspektrometrische Analyse identifizieren; er konnte aber weder eine Co-Lokalisation über Immunofluoreszenz noch eine direkte Interaktion von BRCA1 mit MLH1 feststellen.

Quaresima *et al.* identifizierten 2006 zwei Interaktionsdomänen im BRCA1-Protein, eine im N- und die zweite im C-Terminus des Proteins gelegen (Aminosäuren 1-231 sowie 1552-1861); eine Interaktion mit MLH1 konnte allerdings nur *in vitro* und nur anhand von rekombinanten Proteinen gezeigt werden (Quaresima B. *et al.*, 2006).

Diese beiden Domänen wurde den ersten Co-Immunopräzipitationsexperimenten dieser Arbeit zugrunde gelegt und es konnte gezeigt werden, dass auch *in vivo* diese Interaktion besteht und über Western Blot-Analyse nachweisbar ist. Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte die Interaktion auch anhand von endogenem *fulllength* BRCA1 bewiesen werden.

Entgegen den Ergebnissen von Quaresima postulieren Xie *et al.* und Dohrn *et al.* eine indirekte Interaktion; demnach ist für eine Assoziation von BRCA1 mit MLH1 erst die Bindung an BRIP1 (syn. BACH1 oder FANCI) notwendig (Xie J. *et al.*, 2010; Dohrn L. *et al.*, 2011). Diese indirekte Interaktion könnte ein möglicher Grund dafür sein, dass sowohl MLH1-ITGA9 als auch MLH1 Δ , nicht aber der Wildtyp MLH1, in der Lage sind, direkt an BRCA1 zu binden. Durch die Deletion der Exons 12-19 des Wildtypproteins könnte es zu einer Veränderung der Tertiärstruktur gekommen sein, welche dem trankierten MLH1-Protein schließlich eine direkte Interaktion mit BRCA1 ermöglicht. Diese Veränderung der Tertiärstruktur könnte auch erklären, weshalb MLH1 Δ im Vergleich zu MLH1-ITGA9 stärker an BRCA1 bindet, da das Fusionsprotein durch den zusätzlich vorhandenen C-Terminus des Integrin $\alpha 9$ eine direkte Bindung zumindest teilweise maskieren könnte.

5.4 Konsequenzen der Interaktion von MLH1-ITGA9 und MLH1 Δ mit BRCA1

Als Wang *et al.* im Jahr 2000 MLH1 und BRCA1 in einem gemeinsamen Multiproteinkomplex identifiziert hatte, war das nicht das erste Mal, dass ein Zusammenhang zwischen beiden Proteinen vermutet wurde. Bereits 1996 postulierten Mellon *et al.*, dass BRCA1 mit Mismatch-Reparaturgenen kooperiert, nachdem in MSH2-defizienten Zelllinien in Folge von UV-induzierten und oxidativen DNA-Schäden Defekte in der transkriptionsgekoppelten Reparatur beobachtet wurden. Dieser Defekt wurde auf eine Deregulierung der Mismatch-Reparaturgene oder die Unfähigkeit derer, DNA-Schäden weiter an BRCA1 zu vermitteln, zurückgeführt (Mellon I. *et al.*, 1996; Gowen L. *et al.*, 1998).

Dass BRCA1 im Mismatch-Reparaturmechanismus eine zentrale Rolle einnimmt, wurde auch von Wang Q. vermutet, nachdem die Arbeitsgruppe die physikalische Interaktion zwischen MSH2 und BRCA1 aufgeklärt hatten. Sie mutmaßten, dass der Komplex aus MSH2 und BRCA1 die Aufgabe hatte, Basenfehlpaarungen oder DNA-Läsionen zu erkennen und daraufhin Signale weiterzuleiten, welche entweder die Reparatur, Zellzyklusarrest oder Apoptose zur Folge hatte.

Da Mutationen im BRCA1-Gen vorrangig bei Brust- oder Eierstockkrebs und Mutationen im MSH2-Gen eher bei HNPCC-Patienten zu finden sind, glaubten sie eine mögliche Erklärung für das Auftreten gynäkologischer Tumoren bei HNPCC-Patientinnen bzw. Dickdarmtumoren bei Brust- oder Eierstockkrebspatientinnen gefunden zu haben (Wang Q. *et al.*, 2001).

Bezüglich MLH1 und BRCA1 besteht auf funktioneller Ebene ein Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen durch die Beteiligung an gemeinsamen Signalwegen. Yamane *et al.* zeigten eine Beteiligung von BRCA1 am Mismatch-Reparatursystem anhand von 6-Thioguanin-induzierten Basenfehlpaarungen. BRCA1-positive Zellen konnten zu über 95% einen G₂/M-Arrest hervorrufen, während BRCA1-negative Zellen den Eintritt in die mitotische Phase zu nahezu 0% inhibierten (Yamane K. *et al.*, 2007).

Desweiteren sind MLH1 und BRCA1 beide in der Lage, den ATM/ATR-Signalweg in Folge von DNA-Schäden zu aktivieren. Das Mismatch-Reparatursystem erkennt DNA-Läsionen und verursacht in Folge derer Doppelstrangbrüche, welche wiederum ATM und/oder ATR aktivieren. Diese PI-3-Kinasen phosphorylieren ihre *downstream*-Zielgene BRCA1, p53 und c-Abl. Es wurde auch die Theorie aufgestellt, dass BRCA1 einen stabilen inaktiven Komplex mit c-Abl bilden kann, welcher speziell nach Doppelstrangbrüchen durch ATM aktiviert wird, woraufhin c-Abl vom Komplex abdissoziiert und eine weitere Signalkaskade in Gang setzt (Foray N. *et al.*, 2002).

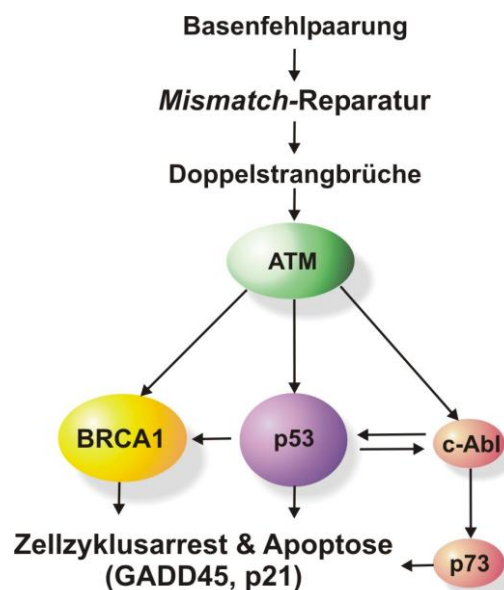


Abbildung 5-1: Vereinfachter Signalweg nach Aktivierung des Mismatch-Reparatursystems. (Erläuterungen siehe Text. Nach (Meyers M. *et al.*, 2003).

Sowohl p53 als auch sein Homolog p73 fungieren nach DNA-Schäden als Transkriptionsfaktoren; da aber gezeigt werden konnte, dass durch das MMR-System induzierter Zellzyklusarrest bzw. Apoptose nach Exposition unterschiedlicher DNA-schädigender Agenzien unabhängig von p53 ablaufen können, wird vermutet, daß eine Aktivierung von p73 durch c-Abl in diesem Zusammenhang ebenfalls eine wichtige Rolle einnehmen könnte (Meyers M. *et al.*, 2003). In Folge dieser Signalkaskaden kommt es schließlich unter anderem zu einer Aktivierung von Zellzyklusproteinen wie GADD45 sowie dem JNK1-Signalweg, was schließlich zu Zellzyklusarrest oder Apoptose führt.

Im Zuge dieser Arbeit sollte anhand verschiedener Experimente die These gestützt werden, dass die Interaktion von MLH1-ITGA9 bzw. MLH1 Δ mit BRCA1 funktionelle Konsequenzen nach sich zieht. Dazu sollten sowohl auf transkriptioneller als auch auf Proteinebene die Auswirkungen untersucht werden. Um die unterschiedlichen Experimente vergleichen zu können, mussten die verwendeten MLH1 defizienten HEK293T-Zellen erst mit Wildtyp MLH1 rekonstituiert werden. Im Anschluss wurden alle Versuchsergebnisse auf die der mit Wildtyp MLH1-transfizierten Zellen bezogen.

Um Einflüsse auf die Transkription zu untersuchen, wurden HEK293T-Zellen mit MLH1-ITGA9, MLH1 Δ sowie Wildtyp-MLH1 transfiziert und anschließend mit 30 μ M Etoposid stimuliert. Im Anschluss an die RNA-Isolierung wurden anhand der revers transkribierten cDNA über quantitative Realtime-PCR die relativen Expressionslevel unterschiedlicher Zielgene untersucht. Auf transkriptioneller Ebene waren die Ergebnisse am deutlichsten sichtbar; es konnte gezeigt werden, dass Zellen, welche das Fusionsprotein MLH1-ITGA9 bzw. MLH1 Δ exprimieren, teilweise eine um 97% niedrigere Expression unterschiedlicher Zellzyklus- oder Apoptosegene bewirkt. Diese Ergebnisse waren in Einklang mit den Schlussfolgerungen, welche sich aus der Analyse des Phosphorylierungsstatus von Histon H2A.X sowie der DNA-Reparaturproteine Chk1/2, p53, p21, cdc2, p38 und JNK ergaben.

Das hierzu angewandte Testsystem bestand aus stabil transfizierten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF), welche ebenfalls mit 30 μ M Etoposid behandelt wurden. Die Detektion der phosphorylierten Proteine erfolgte über spezifische Primärantikörper, welche wiederum durch fluorochromierte Sekundärantikörper analysiert wurden.

Auffallend bei diesem Experiment ist der geringe Phosphorylierungsstatus der Proteine in den untransfizierten MEF; dies könnte ein Hinweis auf eine MLH1-Defizienz in diesen Zellen sein. Apoptosestudien bestätigten schließlich, dass die auf Transkriptions- sowie Proteinebene beobachteten Einflüsse in einer gesteigerten Apoptoseresistenz, zumindest gegenüber DNA-Schäden, welche durch Etoposid verursacht wurden, resultieren.

In immunohistochemischen Analysen konnte diese Interaktion zwischen MLH1-ITGA9 und MLH1 Δ mit BRCA1 auch visuell dargestellt werden. Die Bindung an die zytoplasmatischen Proteine hatte eine zytoplasmatische Retention von endogenem BRCA1 zur Folge, welche durch Abwesenheit nukleärer BRCA1-Foci sichtbar war.

Es konnte gezeigt werden, dass die BRCT-Domäne des BRCA1-Proteins eine entscheidende Rolle für die transkriptionelle Regulierung wichtiger DNA-Reparaturproteine darstellt. Zu diesen Zielgenen gehören zahlreiche Regulatorproteine der genomischen Integrität sowie des Zellzyklus, darunter p53, BLM, FEN1, BRCA2 und GADD153 (De Luca P. *et al.*, 2011). Beispielsweise führte die physikalische Interaktion von BRCA1 mit p53 über die BRCT-Domäne zu einer erhöhten Transkription von p21^{WAF1/CIP1} sowie des BAX-Promotors und damit zu Zellzyklusarrest und Apoptose (Zhang H. *et al.*, 1998). Ein weiteres wichtiges Zielgen von BRCA1 ist GADD45, welches über den JNK/SAPK (Jun N-terminale Kinase/Stress-aktivierte Proteinkinase)-Signalweg ebenfalls Apoptose vermittelt (Harkin D. *et al.*, 1999).

Bedenkt man, dass sich eine der direkten Bindedomänen von MLH1 im BRCA1-Protein mit der BRCT-Domäne deckt, könnte man vermuten, dass durch die Interaktion von MLH1-ITGA9 bzw. MLH1 Δ mit BRCT die transkriptionelle Regulierung wichtiger proapoptischer und zellzyklusregulierender Proteine und somit Zellzyklusarrest und Apoptose unterbunden wird.

Auch die zytoplasmatische Retention von BRCA1 könnte Folgen haben. Die subzelluläre Verteilung von BRCA1 ist ein wichtiger regulatorischer Mechanismus bei der zellulären Reaktion auf DNA-Schäden. Für eine erfolgreiche Reparatur von Doppelstrangbrüchen ist die nukleäre Lokalisation unerlässlich. Handelt es sich allerdings um irreparable Schäden, transloziert BRCA1 ins Zytoplasma und ruft dort Apoptose hervor.

Wang et al. beobachteten, dass eine unterbundene Translokation vom Kern ins Zytoplasma eine Apoptoseinhibition zur Folge hat. Sie vermuteten daher, dass eine zytoplasmatische Akkumulation von BRCA1 zu folgenden Ergebnissen führt:

- Keine Interaktion von BRCA1 mit nukleären Proteinen, welche Zelltod initiieren oder regulieren
- BRCA1 sammelt sich in den Mitochondrien an und löst dort apoptotische Signalkaskaden aus
- Veränderung des Gleichgewichtes zwischen nukleären (DNA-Reparatur) und zytosolischen (Apoptose) hin zu apoptotischen Prozessen im Zytosol (Wang H. *et al.*, 2010).

Punkt 1) deckt sich hierbei mit der bereits erwähnten Vermutung, dass die Interaktion von MLH1-ITGA9 bzw. MLH1 Δ mit BRCA1 zur Folge haben könnte, dass die BRCT-Domäne für die transkriptionelle Regulierung wichtiger Proteine nicht mehr zur Verfügung steht.

Bezüglich Punkt 2) wäre zu überprüfen gewesen, ob die Interaktion zur Folge gehabt hätte, dass weniger BRCA1 in die Mitochondrien gelangen könnte. Dies hätte man beispielsweise durch Isolierung mitochondrieller Proteine überprüfen können; dies wurde in dieser Arbeit allerdings nicht durchgeführt.

Da bereits mehrmals gezeigt werden konnte, dass für die Auslösung apoptotischer Kaskaden eine Lokalisationsänderung von BRCA1 vom Kern ins Zytoplasma notwendig ist, um dort durch Caspase-3 das proapoptotische BRCA1-p90 Spaltprodukt zu bilden (Dizin E. *et al.*, 2008), könnte man auch spekulieren, dass eine Bindung an das Fusionsprotein bereits in Etoposid-unstimulierten Zellen eine zytoplasmatische Retention zur Folge hat und bei Eintritt von DNA-Schäden BRCA1 gar nicht in der Lage ist, in den Kern zu wandern und somit die Lokalisationsänderung von Kern zu Zytoplasma vollständig ausbleibt.

Betrachtet man die Schlüsselrolle von p53 in Bezug auf DNA-Reparaturmechanismen, kann spekuliert werden, dass die Interaktion des Fusionsproteins MLH1-ITGA9 mit BRCA1 auch eine Funktionsänderung bis hin zu einem Funktionsverlust von p53 hervorrufen könnte. Auf Phosphorylierungsebene konnte dies anhand von Western Blot-Analysen gezeigt werden; dabei war der Gehalt an Serin15-phosphoryliertem p53 in wtMLH1 rekonstituierten HEK293T-Zellen am höchsten, während er in Zellen, welche das Fusionsprotein oder seine trunkierte Variante exprimieren, deutlich niedriger war.

Ebenso wie BRCA1 ist p53 ein *shuttle*-Protein, dessen subzelluläre Lokalisation einem Gleichgewicht zwischen Kernimport und -export unterliegt. Ein Kernausschluss ist ein effektiver Mechanismus zur Inaktivierung von p53. Zytoplasmatisches p53 assoziiert hierbei mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett, während ein Teil von p53 auch in den Mitochondrien lokalisiert ist und Teil der nicht-transkriptionell regulierten Apoptose darstellt (O'Brate A. *et al.*, 2003). Geht man nun davon aus, dass p53 physikalisch mit BRCA1 interagiert, welches hier aber nur noch im Zytoplasma und nicht mehr im Kern vorhanden ist, wären ein Funktionsverlust und eine Unterbrechung der Signalkaskade die Folge und die Zelle würde eine gesteigerte Apoptoseresistenz aufweisen.

Über *Focus Formation*-Assays sollte schließlich das onkogene Potential des Fusionsproteins festgestellt werden. Auch hierfür wurden stabil transfizierte murine embryonale Fibroblasten verwendet, welche das Fusionsprotein bzw. deren N- (MLH1 Δ) oder C-Terminus (Δ ITGA9) unter der Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren Promotors exprimieren. Nach 14 Tagen war das Ergebnis, dass weder das gesamte MLH1-ITGA9-Protein noch ein Teil davon über ein ausreichend onkogenes Potential verfügen, welcher einen Verlust der Kontaktinhibition hätte hervorrufen können; dieselbe Beobachtung wurde auch nach 3 Wochen gemacht. Diese Ergebnisse stehen in Kontrast zu denen von Meyer *et al.*, welche 2009 erstmals das Fusionsprotein publizierten und bei einem damals durchgeführten *Focus Formation*-Assay einen Verlust der Kontaktinhibition feststellten. Die Autoren selbst betrachteten diese Erkenntnisse allerdings kritisch, da eine ektope Überexpression eines Proteins nicht vergleichbar ist mit dem durch endogene Proteine verursachten biologischen Phänotyp.

Das Resultat, dass das Fusionsprotein nicht annähernd so onkogen ist wie beispielsweise H-ras, steht jedoch im Einklang mit der Tumorentwicklung bei den Patienten der Familie aus Französisch-Guayana. Der Krankheitsbeginn tritt erst in späteren Jahren auf und scheint im Vergleich zu aggressiven Karzinomen auch langsamer voranzuschreiten; allerdings treten die Tumoren dann aber auch in Organen auf, welche eher untypisch für rein MLH1-defiziente Tumoren sind.

Um den Pathomechanismus allerdings genauer zu untersuchen, welcher der Tumorgenese verursacht durch das Fusionsprotein zugrunde liegt, müssten effizientere *in-vivo*-Modelle (z.B. Maus-Modelle) oder Original-Tumorgewebe zu Rate gezogen werden; auch die Deletion der drei Gene LRRFIP2, GOLGA4 sowie APRG1 müssten dabei berücksichtigt werden. Trotzdem konnte in der vorliegenden Arbeit ein neuer Mechanismus aufgedeckt werden, der für alle MLH1 Genvarianten in Frage kommt, bei denen die Kernlokalisationssequenz (AS 457-494) des MLH1 Proteins eliminiert wird - durch premature Stopcodons, 3'-Deletionen oder einer Genfusion. Solche MLH1 Proteinvarianten führen zu cytoplasmatischen Komplexen mit BRCA1 und dadurch zur Inaktivierung von p53-abhängigen Prozessen. Dies kommt einem funktionellen p53 k.o. gleich und kann damit entscheidend zur Krebsentwicklung beitragen.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Chemikalien

Chemikalien	CAS-Nummer	Bezugsquelle
6-Aminocapronsäure	60-32-2	Roth
Acetonitril	75-05-8	Roth
Acrylamid	79-06-1	Roth
Agar	9002-18-0	Sigma
Agarose	9012-36-6	Invitrogen
Ameisensäure	64-18-6	Sigma
Ammoniumhydrogensulfat	7803-63-6	Fluka
Ammoniumperoxodisulfat (APOD)	7727-54-0	Roth
Ammoniumsulfat	7783-20-2	Roth
Ampicillin	69-53-4	Roth
Avidin	1405-69-2	IBA GmbH
Biotin	58-85-5	Sigma
Bis(sulfosuccinimidyl)suberat (BS ³)	82436-77-9	Thermo Scientific
Bisacrylamid	110-26-9	Roth
Borsäure	52869-79-1	Merck
Bovines Serumalbumin (BSA)	9048-46-8	Roth
Bromphenolblau	115-39-9	Roth
Calciumchlorid	10043-52-4	Merck

Material und Methoden

Coomassie-Brillantblau G-250	6104-58-1	Sigma
Coomassie-Brillantblau R-250	6104-59-2	Sigma
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	-	Peqlab
Desthiobiotin	533-48-2	IBA GmbH
Dimethyl 3,3'-dithiobispropionimidat•2 HCl (DTBP)	38285-78-8	Thermo Scientific
Dithiothreitol (DTT)	3483-12-3	Biomol
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	60-00-4	Roth
Etoposid	33419-42-0	Sigma
Fugene 6	-	Roche
Glycerol	56-81-5	Roth
Glycin	87867-94-5	Roth
Harnstoff	57-13-6	Roth
Immersionol™ 518 F	-	Zeiss
Iodacetamid	144-48-9	Fluka
Isopropanol	67-63-0	Roth
Kanamycin	25389-94-0	Roth
Kristallviolett	548-62-9	Sigma
L-Glutamin 200 mM	8063-07-8	PAA
Lipofectamine™ 2000	-	invitrogen
Lysozym	9001-63-2	Sigma
Magnesiumchlorid	7786-30-3	Merck
Magnesiumsulfat	7487-88-9	Roth

Material und Methoden

MaxGel™ ECM Matrix	-	Sigma
MG132	133407-82-6	BostonBiochem
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin- N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES)	7365-45-9	Roth
N, N, N', N',-Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	110-18-9	Fluka
Natriumacetat	127-09-3	Merck
Natriumchlorid	7647-14-5	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	151-21-3	Biomol
Natriumfluorid	7681-49-4	Riedel-de Haën
Natriumhydrogenphosphat	7558-79-4	Merck
Natriumorthovanadat	13721-39-6	Sigma
N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid (CAPS)	1135-40-6	Sigma
Paraformaldehyd	30525-89-4	Roth
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	329-98-6	Roth
Polyethylenimin (PEI)	9002-98-6	Sigma
Propidiumiodid	25535-16-4	Sigma
Roentogen Liquid (Entwicklerlösung)	-	Tetenal
Roentogen Superfix (Fixierlösung)	-	Tetenal
Saccharose	57-50-1	Roth
β-Mercaptoethanol	60-24-2	Invitrogen
Trichloressigsäure (TCA)	76-06-9	Roth
Triethylammoniumbicarbonat (TEAB)	15715-58-9	Sigma

Material und Methoden

Trifluoressigsäure (TFA)	407-25-0	Sigma
Triton X-100	9002-93-1	Sigma
Trockenmilch (non fat)	-	Granovita
Trypan Blue Stain	72-57-1	Sigma
Tween20	9005-64-5	Roth
Xylen-Cyanol-FF	4463-44-9	Merck
Yeast Extract	8013-01-2	Oxoid

6.1.2 Puffer

Puffer	Zusammensetzung	
Anoden-Puffer I pH 10,4	300 mM	Tris
	20 %	Methanol
Anodenpuffer II pH 10,4	25 mM	Tris
	20 %	Methanol
CaCl ₂ -Transformationspuffer	10 mM	Tris
	10 mM	CaCl ₂
	10 mM	MgCl
CAPS-Puffer	10 mM	CAPS pH 11
	0,1 %	Methanol
	0,01 %	SDS
DNA-Ladepuffer	50 %	Saccharose
	100 mM	EDTA
	0,1 %	Brom-Phenol-Blau
	0,1 %	Xylen-Cyanol-FF
E-Gel-Puffer (pH 7.9)	40 mM	Tris
	2mM	EDTA
	0.5 mM	NaAc

Material und Methoden

Elektrodenpuffer	3,03 g	Tris
	14,4 g	Glycin
	1,0 g	SDS
	ad 1000 ml	Wasser
Elutionspuffer 1 (2 mM Biotin) pH 8,0	100 mM	Tris/ HCl
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	2 mM	Biotin
Elutionspuffer 2 (Desthiobiotin) pH 8,0	100 mM	Tris/ HCl
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	5 mM	Desthiobiotin
Elutionspuffer 3 (10 mM Biotin) pH 8,0	100 mM	Tris/ HCl
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	10 mM	Biotin
Entfärbelösung	100 ml	Essigsäure
	100 ml	Methanol
	ad 1000 ml	Wasser
Färbelösung (Coomassie Standard-Lsg.)	0,8 g	Brillantblau R-250
	100 ml	Isopropanol
	40 ml	Essigsäure
	ad 500 ml	Wasser
Fixierlösung	12 g	TCA
	ad 100 ml	Wasser
Kathodenpuffer pH 9,4	25 mM	Tris
	40 mM	6-Aminocapronsäure
	20 %	Methanol
2x-Lämmli-Puffer	100 mM	Tris/ HCl pH 6.8
	200 mM	DTT
	4 %	SDS

Material und Methoden

	20 %	Glycerol
	0,2 %	Bromphenolblau
lowTE	10 mM	Tris/HCl (pH 8,0)
	0,1 mM	EDTA
Lysispuffer pH 7,5		NaCl
		HEPES
	150 mM	TritonX-100
	20 mM	EDTA
	1%	
frisch zugegeben:	0,4 mM	Na ₃ VO ₄
		NaF
	1 mM	PMSF
	10 mM	Protease Inhibitor cocktail Set V,
	1 mM	EDTA free (100x Stock solution,
		Calbiochem)
Neutralisationspuffer	1M	Tris/HCl pH9
Neutralisierungslösung	6 g	Tris
	ad 500 ml	Wasser mit H ₃ PO ₄ auf pH 6,5 einstellen
Sammelgelpuffer pH 6,8	1 M	Tris mit HCl auf pH 6,8 einstellen
10 % ige SDS-Lösung	10 g	SDS auf 100 ml H ₂ O
ST-Puffer	80 %	Saccharose
	5 %	Triton X100
	50 mM	EDTA
	50 mM	Tris/HCl (pH8,0)
TBE-Puffer	100 mM	Tris
	500 mM	H ₃ BO ₃
	2,5 mM	EDTA
TBS-Puffer	50 mM	Tris

Material und Methoden

	150 mM	NaCl mit HCl auf pH 7,4 einstellen
Trenngelpuffer pH 8,8	1 M	Tris mit HCl auf pH 8,8 einstellen
Waschpuffer pH 8,0	100 mM	Tris/ HCl
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
Waschpuffer (Zelladhäsions-assay)	0,1%	BSA in DMEM
Blockierpuffer (Zelladhäsionsassay)	0,5%	BSA in DMEM
Kristallviolettlösung	5 mg/ml	Kristallviolett in
	2%	Ethanol

6.1.3 Enzyme

Enzyme	EC-Nummer	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	3.1.3.1	New England Biolabs
Go Taq Polymerase	3.1.21.4	Promega
5 Prime Polymerase	2.7.7.7	Promega
Restriktionsendonukleasen	3.1.11.xx – 3.1.31.xx	New England Biolabs
T ₄ DNA-Ligase	6.5.1.1	New England Biolabs
T ₄ DNA Quick-Ligase	6.5.1.1	New England Biolabs
T ₄ Polynukleotid-Kinase	2.7.1.78	New England Biolabs
Klenow-Polymerase	2.7.7.7	Promega
RNase	3.1.27.5	Sigma

6.1.4 Antikörper

Primäre Antikörper

Name	Organismus	Verdünnung	Hersteller	Beschreibung
MLH1-Antikörper				
anti-MLH1 (sc)	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz	Polyklonaler Antikörper gegen den N-Terminus von MLH1
anti-MLH1	Kaninchen	1:1000	Sigma	Monoklonaler Antikörper gegen den N-Terminus von MLH1
anti-BRCA1	Kaninchen	1:5000	abcam	Polyklonaler Antikörper; gegen die letzten 100 Aminosäuren von BRCA1 gerichtet
anti-BRCA1	Maus	1:50	abcam	Monoklonaler Antikörper gegen die ersten 304 Aminosäuren von BRCA1 (N-Terminus)
anti-BRCA1	Maus	1:200	Santa Cruz	Monoklonaler Antikörper gegen ein Epitop zwischen den AS 1842-1862 des BRCA1-C-Terminus
anti-BRCA1	Hase	1:1000	Cell Signaling	Polyklonaler Antikörper gegen total BRCA1 Protein
anti-active Caspase 3	Kaninchen	1:50	abcam	Polyklonaler Antikörper; erkennt das p17-Fragment der aktiven Caspase 3

Material und Methoden

ITGA9-Antikörper				
anti-Integrin alpha 9	Maus	1:500	abcam	Monoklonaler Antikörper gegen die AS 785-887 von ITGA9
anti-Integrin alpha 9	Hase	1:200	Santa Cruz	Polyklonaler Antikörper gegen die AS 783-980 von ITGA9
anti-FAK	Kaninchen	1:600	abcam	Polyklonaler Antikörper gegen FAK S-T-Y ⁵⁶⁶ -Y-K
anti-phospho- FAK	Kaninchen	1:500	abcam	Polyklonaler Antikörper; erkennt phosphoryliertes Tyrosin 577
anti-Paxillin	Maus	1:1000	abcam	Monoklonaler Antikörper gegen das full length Protein
anti-Integrin beta 1	Maus	1:40	abcam	Monoklonaler Antikörper gegen das full length Protein
anti-Src	Maus	1:40	abcam	Monoklonaler Antikörper gegen das full length Protein
anti-phospho-Src	Kaninchen	1:600	abcam	Polyklonaler Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin 418
Tag-Antikörper				
anti-Flag	Maus	1:1000	Sigma	Monoklonaler Antikörper gegen das Flag-Peptid (DYKDDDDK)
anti-Strep	Maus	1:400	IBA GmbH	Meerrettichperoxidase- gekoppelter monoklonaler Antikörper

Material und Methoden

				gegen das Strep-Tag (WSHPQFEKGGGSG GGSGGGSWSHPQFEK)
Modifikationen				
anti- Phosphoserin	Kaninchen	1:120	abcam	Polyklonaler Antikörper; erkennt phosphorylierte Serinreste
Signalweg-Antikörper				
anti-p53	Maus	1:50	abcam	Monoklonaler Antikörper; erkennt ein Epitop innerhalb der AS 20-25 des C-Terminus von p53
anti-p53	Maus	1:1000	Cell Signaling	Monoklonaler Antikörper gegen ein Epitop, das Ser20 des humanen p53 umgibt
anti-phospho- p53	Maus	1:1000	Cell Signaling	Monoklonaler Antikörper gegen Phospho-Ser15 des humanen p53
anti-c-jun	Hase	1:1000	Cell Signaling	Monoklonaler Antikörper gegen den N-Terminus von humanem c-jun
anti-phospho-c- jun	Hase	1:1000	Cell Signaling	Polyklonaler Antikörper gegen phosphoryliertes Ser63 von humanem c-jun
anti-MEKK1	Maus	1:100	Santa Cruz	Monoklonaler Antikörper gegen eine 300 Aminosäuren umfassende interne Region von humanem MEKK1

Material und Methoden

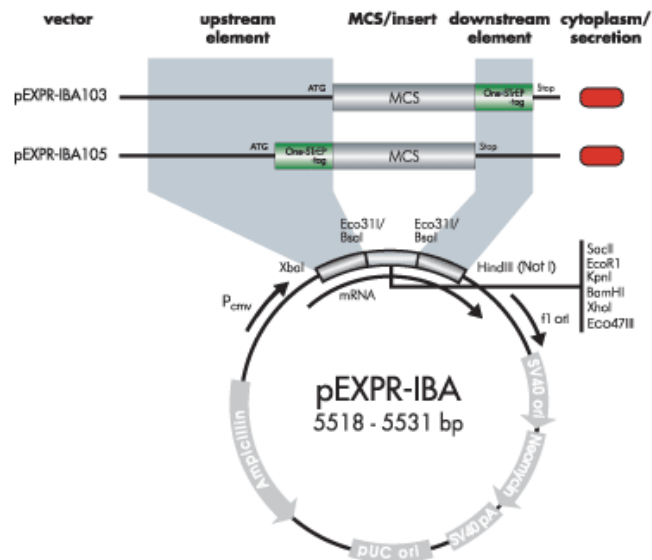
anti-phospho- MEKK1	Hase	1:200	Santa Cruz	Polyklonaler Antikörper gegen phosphoryliertes Thr1402 von humanem MEKK1
------------------------	------	-------	------------	---

Sekundäre Antikörper

Name	Verdünnung	Hersteller	Beschreibung
anti-mouse	1:10000	GE Healthcare	anti Maus IgG
anti-rabbit	1:10000	GE Healthcare	anti Kaninchen IgG
anti-rabbit-FITC	1:200-400 (IHC)	santa Cruz	anti Kaninchen IgG
anti-rabbit-PE (Phycoerythrin)	1:200-400 (IHC)	santa Cruz	anti Kaninchen IgG
anti-mouse- Rhodamine	1:200-400 (IHC)	santa Cruz	anti Maus IgG

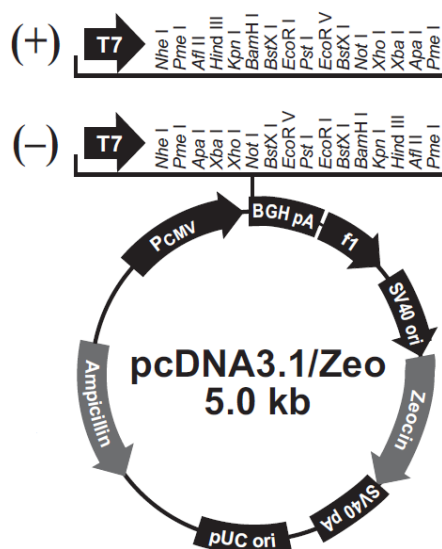
6.1.5 Plasmide und Vektoren

pEXPR-IBA103/105 (IBA BioTAGnology)



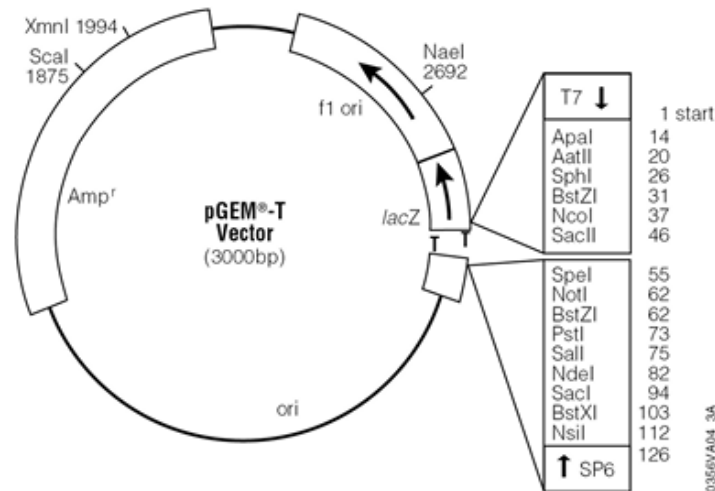
pEXPR-IBA103 und -105 sind Expressionsvektoren, welche sowohl eine N- (103) als auch eine C-terminale (105) Fusion des *bait*-Proteins ermöglichen. Der humane Cytomegalie-Virus (CMV) -Promotor sorgt dabei für eine starke Expression in einer Vielzahl von Zellen.

pcDNA™3.1/Zeo (+) und pcDNA™3.1/Zeo (-) (Invitrogen)



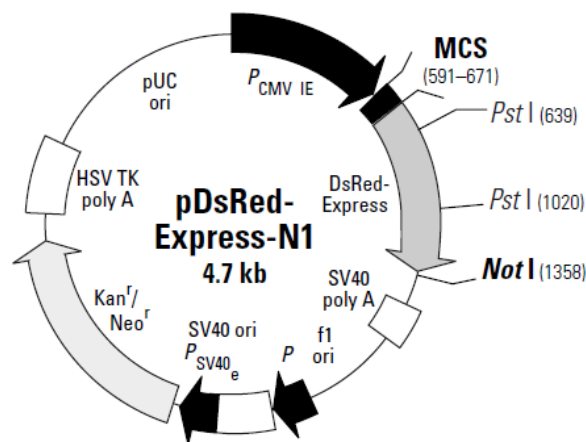
Ca. 5.0 kb große Vektoren zur stabilen und transienten Expression in Säugetierzellen. (+) und (-) repräsentieren dabei die Multiple Klonierstelle in *forward* (+) und *reverse* (-) Orientierung, als Promotor dient der CMV-Promotor.

pGEM[®]-T Vektor (Promega)



Das pGEM[®]-T Vektorsystem dient dem Klonieren von PCR-Produkten. Der geschnittene Vektor besitzt einen 3'-Thymidin (T)-Überhang, welcher gemeinsam mit dem von der Taq-Polymerase stammendem Adenosin (A)-Überhang des PCR-Produktes eine Ligation erleichtert und die Rezirkularisierung des Leervektors verhindert.

pDsRed-N1 (*clontech*)



pDsRed-Express-N1 ist ein Säuger-Expressionsvektor welcher für DsRed-Express, eine Variante des *Discosoma sp. red fluorescent Protein (DsRed)* kodiert. Die multiple Klonierstelle befindet sich zwischen dem CMV-Promotor und der DsRed-Express kodierenden Sequenz. In *E.coli* erfolgt die Selektionierung über Kanamycin.

6.1.6 cDNA-Klone

Alle Full Length cDNA-Klone stammen von der Firma ImaGenes GmbH und dienen in diversen Klonierungen als Template.

Gen	Klonname	Vektor	Antibiotika-Resistenz
Src	IRAU _{p969D0365D}	pOTB7	Chloramphenicol
Paxillin	IRAU _{p969D07104D}	pOTB7	Chloramphenicol
BRCA1	IRCM _{p5012H0538D}	pCR-BluntII-TOPO	Kanamycin
ITGB1	IRAT _{p970E0719D}	pCMV-SPORT6	Ampicillin

6.1.7 Synthetische Oligonukleotide

6.1.7.1 Oligonukleotide für Sequenzierungen

Name	Sequenz
DsRed-Seq3'	5'-TGACGCAAATGGGCGGTAGG-3'
DsRed-Seq5'	5'-TCGCCCTCGATCTCGAACTC-3'
BRCA1Seq1	5'-GAAAGGGCCTTCACAGTGTC-3'
BRCA1Seq2	5'-TGAGAAGCGTGCAGCTGAGA-3'
BRCA1Seq3	5'-CTGCCATGCTCAGAGAATCC-3'
BRCA1Seq4	5'-CTATCGGAAGAAGGCAAGCC-3'

Material und Methoden

BRCA1Seq5	5'- CTAACCCAATAGAATCACTCGA-3'
BRCA1Seq6	5'- GTAACAAGCCAAATGAACAGACA-3'
BRCA1Seq7	5'- CAAATAAATGTGTGAGTCAGTG-3'
BRCA1Seq8	5'- AGTCTAATATCAAGCCTGTACAG-3'
BRCA1Seq9	5'- CAATTAGCCGTAATAACATTAGAG-3'
BRCA1Seq10	5'- GGAAGTAGTCATGCATCTCAGG-3'
BRCA1Seq11	5'- TCTGTCTAAGAACACAGAGG-3'
BRCA1Seq12	5'- CTTAGGTGAAGCAGCATCTGG-3'
BRCA1Seq13	5'- GACAAGTTTGAGGTGTCTGC-3'
BRCA1Seq14	5'- AGAGTCAGCTCGTGTTGGCA-3
BRCA1Seq15	5'- AGATGCTGAGTTTGTGTGTG-3'
BRCA1Seq16	5'- CTTTCATCATTCACCCTTGG-3'
MLH1*E2R1	5'-CGTTTTAGGTGTTCATAAGTTCACTAA-3'
MLH1*E1F1	5'-ATGTCGTTTCGTGGCAGGGGTTATTCGGC-3'
MLH1*SeqF2.1	5'-ACACTACCCAATGCCTCAAC-3'
MLH1*Seq2F	5'-CGAAAACAGCTGATGGAAAGTGTGC-3'
MLH1*Seq3F	5'-GAATGGTTACATATCCAATG-3'
MLH1*Fo	5'-GTTAATGTGCACCCCACAAAGCATGA-3'
ITGA*F6	5'-GATGCCAACGTGTCCTTCAA-3'
ITGA*SeqF6.1	5'-CTGAATCCCTGCATGACAACACCC-3'
ITGA*F7	5'-CATGTCTCCAACCTCCTTTG-3'
ITGA*SeqF7.1	5'-CAGCTGGATGACCTGGAGTG-3'
ITGA*F8	5'-TATCTTCCACACAATATTTGCT-3'
ITGA*SeqF8.1	5'-AAGAGGTGACGGTGGTCTTC-3'

ITGA*F₉ 5'-GCTGGCCGTGCTGCTCTGGA-3'

6.1.7.2 Oligonukleotide für Klonierungen

Name	Sequenz
ITGA ₉ _KpnI*5'	5'-gacggtaccctggTTTTCTGGACCCAGTC-3'
ITGA ₉ _BamHI*3	5'-CTGTCATCCAGTTCATGTCC-3'
pIBA-Linker ENKX*5'	5'-tcgacggtaccgatatcgctagcc-3'
pIBA-Linker ENKX*3	5'-AATTGGCTAGCGATATCGGTACCG-3'
MLH1-ITGA ₉ ΔKpnI.R.	5'-GACGGTACCCTGGTTTTCTGGACCCAGTCCCAACT-3'
NheI-MLH1.F.	5'-CTAGCTAGCATGTCGTTCTGGCAGGGGTTATT-3'
AleI_MLH1ΔStop-3'	5'-GGCACTGAGGTGAATTGGGACGAAG-3'
Xho_MLH1ΔStop-5'	5'-CCGCTCGAGCGGACACCTCTCAAAG-3'
EcoRI-ITGA ₉ -3'	5'-CAGCGTGGGATTTCTTTCA-3'
EGFP-KpnI-5'	5'-ACGTGGTACCCTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'
SacII-MLH1-3'	5'-TCCCCGCGGGAATGTCGTTTCG-3'
ITGA ₉ -EcoRV-5'	5'-CCGATATCTCACTGGTTTTCT-3'
EGFP-SbfI-5'	5'-cctgcaggctctgtacagct-3'
XhoI-Flag	5'-TCGAGGATTACAAGGATGACGACGATAAGTGAGAT-3'
Flag-EcoRV	5'-ATCTCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATCC-3'
EcoRV-Flag	5'-ATCGATTACAAGGATGACGACGATAAGTGAA-3'
Flag-HindIII	5'-AGCTTTCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATCGAT-3'
EcoRI-MLH1	5'-GAATTCATGTCGTTCTGGCAGGGGTTATTCGG-3'
MLH1-KpnI	5'-GGTACCCTGGGTGAAGTACATCCTGGAGGAATTGGA-3'
XbaI-MLH1	5'-GCTCTAGAATGTCGTTCTGGCAGGGGTTATTCGGC-3'

Material und Methoden

ITGA9ΔTMD-KpnI	5'-GGTACCGATCCACCCCACGACGTAGCCACGGG-3'
XhoI-mCherry-3'	3'-CCGCTCGAGatggtgagcaagggcgagg-5'
mCherryΔStop-EcoRV-5'	3'-GATATCCTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'
EcoRV-mCherry-3'	3'-GATATCatggtgagcaagggcgagg-5'
mCherry-EcoRV-5'	5'-GATATCTTACTTGTACAGCTCGTCCAT-3'
XhoI-Flag-3'	3'-TCGAGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGAT-5'
Flag-EcoRV-5'	5'-ATCCTTATCGTCGTCATCCTTGTAAATCC-5'
XhoI-BRCA1	5'-CCGCTCGAGATGGATTTATCTGCTCTTCGCGTTG-3'
BRCA1-EcoRV	5'-GATATCGTAGTGGCTGTGGGGGATCTGG-3'
EcoRV-mCherry-3'	5'-GATATCatggtgagcaagggcgagg-3'
mCherry-HindIII	5'-CCCAAGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3'
KpnI-ITGA9deltaM	5'-CGGGGTACCATGACTGTTTTTGAAGGAATTG-3'
ITGA9deltaM-XhoI	5'-CCGCTCGAGCTGGTTTTTCTGGACCCAGTC-3'
BRCA1-N-EcoRV-5'	5'-TCGATATCCGTCTCAGAAAATTCACAAGCAGCC-3'
XhoI-BRCA1-C-3'	5'-CCGCTCGAGATGACATCTTACTTGCCAAGGCAA-3'
BRCA1-Linker-3'1	5'-TCGAGCGGCGACGCGTCGCTTAA-3'
BRCA1-Linker-3'2	5'-GGATATCAAAAGTACTTTTTTCGC-3'
BRCA1-Linker-3'3	5'-GACGAGCTCGCCCAAGCTTGGGA-3'
BRCA1-Linker-5'1	5'-AGTACTTTTTGATATCCTTAAGCGACGCGTCGCCGC-3'
BRCA1-Linker-5'2	5'-CCGGTCCCAAGCTTGGGCGAGCTCGTCGCGAAAA-3'
BRCA1a-AfIII-5'	5'-TGGCTTAAGTTGGGGAGGCTTGCCTTCTCCGATA-3'
AfIII-BRCA1b-3'	5'-AACTTAAGCCATGTAAGTAAAATCTAATTATAGGAG-3'
BRCA1b-Scal-5'	5'-TAGTACTGGAACCTACTTCATTAATATTGCTTGAG-3'

ScaI-BRCA1c-3'	5'-CCAGTACTAATGAAGTGGGCTCCAGTATTAATGAAATA-3'
BRCA1c-SacI-5'	5'-ATGAGCTCCTCTTGAGATGGGTAGTTTCTATTCT-3'
SacI-BRCA1d-3'	5'-GAGGAGCTCATTAAGGTTGTTGATGTGGAGGAGCAAC-3'
BRCA1d-AgeI-5'	5'-GACCGGTGCGTAGTGGCTGTGGGGGATCTGG-3'
MLH1wt-KpnI-5'	5'-CGGGGTACCCGGACACCTCTCAAAGACTTTGTAT-3'
EcoRV-mCherry	5'-CGGATATCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG-3'
mCherry-HindIII	5'-CCCAAGCTTTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'
AgeI-mCherry-3'	5'-GCACCGGTGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGAT-3'
mCherry-NotI-5'	5'-TTTTCTTTTTCGCGCCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG- 3'
NheI-MIF-3'	5'-CTAGCTAGCATGCCGATGTTTCATCGTAAACACCAACG-3'
MIF-XhoI-5'	5'-CCGCTCGAGGGCGAAGGTGGAGTTGTTCCAGCCC-3'
BamHI-BRCT-3	5'-CGCGGATCCGATACCATGCAACATAACCTGATAAAGC-3'
BRCT-HindIII-5	5'-CCCAAGCTTTCAGTAGTGGCTGTGGGGGATCTGG-3'

6.1.7.3 Oligonukleotide für Quantitative und Reverse-Transkriptase-PCR

Name	Sequenz
p21-realT-3'	5'-CTGGTGATGTCCGACCTG-3'
p21-realT-5'	5'-TTATCGGGGTCTACGTTGAGC-3'
GADD45-realT-3'	5'-AGTCAGCGCACGATCACTGT-3'
GADD45-realT-5'	5'-GGATCAGGGTGAAGTGGATCTG-3'
MDM2-realT-3	5'-TCCCCGTGAAGGAAACTGG-3'
MDM2-realT-5'	5'-TTTCGCGCTTGGAGTCG-3'
BAX-realT-3'	5'-CCTTTTCTACTTTGCCAGCAAAC-3'

BAX-realT-5'	5'-GAGGCCGTCCCAACCAC-3'
PUMA-realT-3'	5'-CCTGGAGGGTCCTGTACAATCT-3'
PUMA-realT-5'	5'-GCACCTAATTGGGCTCCATCT-3'
p73neu-realT-3'	5'-CTCCATCAGCTCCAGGCTCT-3'
p73neu-realT-5'	5'-CATGGAGACGAGGACACGTACTAC-3'
p53-realT-3'	5'-TGATCGCTGGTCCCCTC-3'
p53-realT-5'	5'-ACGTGGTGAGACGCTGCC-3'
p63-realT-3'	5'-CACACAGACAAATGAATTCCTCAGT-3'
p63-realT-5'	5'-CATCCACAAAGTTCAAGTCAATGG-3'
RT-MLH1deltaT-5'	5'-CTAACATCAGCTACTGTCTCTCC-3'
RT-ITdeltaM-5'	5'-TCTGCACCACCAGATGAGAGTCGA-3'
RT-RAS-3'	5'-ATGACAGAATACAAGCTTGTGG-3'
RT-RAS-5'	5'-GCCAGGTCACACTTGTTGCCCA-3'

6.1.8 DNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichtsmarker

DNA-Längenstandards	Fragmentgrößen in bp	Hersteller
λ-Clal-DNA-Marker	10496, 6262, 4198, 3673, 2614, 1915, 1804, 1704, 1112, 937, 657, 621, 537, 350	Promega (λ-DNA) / New England Biolabs (Clal)
1 kb DNA Ladder	10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500 bp	New England Biolabs
100 bp DNA Ladder	1517, 1200, 1000, 900, 800	New England Biolabs

	700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp	
50 bp ladder	1350, 916, 766, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp	New England Biolabs
Protein- Molekulargewichtsmarker	Fragmentgrößen in kDa	Hersteller
Prestained Protein Marker, Broad Range (1-175 kDa)	175, 80, 58, 46, 30, 25, 17, 7	New England Biolabs
Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa)	230, 150, 100, 80, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10	New England Biolabs
ColorPlus Prestained Protein Ladder, Broad Range (10-230 kDa)	230, 150, 100, 80, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10	New England Biolabs

6.1.9 Organismen

6.1.9.1 Prokaryontische Stämme

Stamm	Genotyp
E.coli TOP10	mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Δ lacX74, deoR, recA1, araD139 Δ (ara-leu)7697, galK, rpsL, endA1, nupG
E.coli SCS110	rpsL thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ (lac-proAB)
E.coli JM110	rpsL thr leu thi lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm glnV44 Δ (lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB+ lacIq lacZ Δ M15] hsdR17(rK-mK+)
E.coli SureTM	endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14- Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 F'[proAB+ lacIq lacZ Δ M15 Tn10]

6.1.9.2 Säugetierzelllinien

Zelllinie / ATCC-Code	Zelltyp	Nährmedium
HEK 293T / CRL-11268	Humane embryonale Nierenzelllinie, die mit dem Adenovirus Typ 5 (Graham <i>et al.</i> , 1977) sowie mit dem SV40 Large T Antigen transformiert wurde. Letzteres erlaubt die Transfektion von Vektoren, die die Expression des SV40 Large T Antigens zur episomalen Replikation benötigen.	DMEM low glucose, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin
Sk-HEP-1 / HTB-52	Humane Leberkarzinomzellen aus dem Aszites eines 52-jährigen Mannes (Fogh <i>et al.</i> , 1977)	DMEM low glucose, 10% FCS, 1% Ciprofloxacin, 1% L-Glutamin
U2-OS / HTB-96	Humane Osteosarkomzellen aus dem Knochengewebe einer 15-jährigen Patientin (Ponten <i>et al.</i> , 1964)	DMEM low glucose, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin
HeLa / CCL-22	Epitheloide humane Zervix-Karzinomzellen einer 31-jährigen Frau (Gey <i>et al.</i> , 1952)	DMEM high glucose, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin
NIH/3T3 / CRL-1658	Murine embryonale Fibroblasten (Todaro <i>et al.</i> , 1963) ; die käuflich erworbene Zelllinie MEF/3T3 von Clontech exprimiert zusätzlich den Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator (tTA), welcher nach Bindung an ein Tetrazyklin die Transkription des Zielgens verhindert (Tet-Off®)	DMEM high glucose, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte bei 5% CO₂, 37°C und 95% relativer Luftfeuchtigkeit.

6.1.10 Nährmedien

6.1.10.1 Nährmedien für Bakterien

Medium		Zusammensetzung
	1 M	NaCl
Salzlösung (E-Transformation)	100 mM	MgCl ₂
	100 mM	MgSO ₄
SOB-Medium	2 % (w/v)	Bacto-Tryptone
	0.5 % (w/v)	Yeast Extract
YT-Medium	1 %	Bacto Tryptone
	0,5 %	Yeast Extract
	0,5 %	NaCl
YT-Agar	1.2 %	Agar
YT _{amp} -Medium	100 µg/ml	Ampicillin
YT _{kan} -Medium	25 µg/ml	Kanamycin

6.1.10.2 Nährmedien für Säugetierzelllinien

Medium	Bezugsquelle
Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM, low glucose (1g/l), 25mM HEPES, with L-Glutamin	PAA
Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM, high glucose (1g/l), 25mM HEPES, with L-Glutamin	PAA
Penicillin / Streptomycin	PAA
Fetal Bovine Serum "Gold"	PAA
L-Glutamin	PAA

6.1.11 Kits und gebrauchsfertiges Material

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
3MM Chromatographiepapier	Whatman
96-well Platten	Greiner
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer
Cellstar Gewebekulturschalen (Ø10 und 15 cm)	Greiner bio-one
Chromatographiesäulchen	BioRad
ECL Western Blotting Analysis System	GE Healthcare
Flag-Beads	Sigma
Flag-Peptid	Sigma
Mikrozentrifugengefäße/ Caps	Eppendorf
PathScan® Multi-Target HCA DNA Damage Kit	Cell Signaling
PCR-Gefäße	Greiner Bio-one
Polypropylene Säulen (5 ml)	Quiagen

Protease Cocktail Set	Calbiochem
Protein G PLUS Agarose	Santa Cruz
Protein-G-Sepharose 4 Fast Flow	Sigma
Pure Yield Plasmid Purification System	Promega
PVDF Membran	GE Healthcare
Qiagen Gel Extraction Kit	Quiagen
Qiagen PCR Purification Kit	Quiagen
Röntgenfilme Fujifilm	Fujifilm
Sequenziergefäße	PE Applied Biosystems
Sequenziergefäße	PE Applied Biosystems
Sterile Pipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner bio-one
Sterile Pipettenspitzen (1000, 200, 20 µl)	Greiner bio-one
Strep-Tactin Säulen	IBA GmbH

6.1.12 Verwendete Datenbanken

Name	Web-Adresse
NCBI (National Center of Biotechnology Information)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Expasy Molecular Biology Server	http://www.expasy.org
STRING 8.3	http://string-db.org
Biogrid ^{3,1}	http://thebiogrid.org
UniProt	http://www.uniprot.org
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html
iHOP	http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/

MASCOT

<http://www.matrixscience.com>

6.1.13 Geräte und Zubehör

Geräte	Bezugsquelle
"UNICORN Version 3.21.02" software	GE Healthcare
Abi Prism 310 Genetic Analyzer	PE Applied Biosystems
Accu-Jet	Braun
Agarosegel-Elektrophoresekammer	Owl Seperation Systems
Blotting-Apparatur	C.B.S Scientific EBU-4000
DNA/RNA Messgerät Gene Quant 1300	GE Healthcare
Durchflusszytometer	Partec
ELISA Reader MR 5000	Dynatech
Fluoreszenz-Mikroplatten-Reader (<i>Tecan-Reader</i>)	Tecan
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss Observer.Z1
Gel imaging system ChemiDoc™ XRS+	BioRad
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop (CLSM)	Zeiss LSM 10
Maxigelapparatur	Biometra®
Mikroskop	Nikon
Minigelapparatur	Biometra®
Netzgerät/PS500XT DC Power Supply	Hofer Scientific Instruments
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Odyssey Imager	Li-Cor Biosciences
PCR-Geräte	PE Applied Biosystems

Material und Methoden

pH-Meter	Inolab
Roller Mixer stuartsr60	Stuart
Rotator	Stuart
StepOne™ Plus Real-time PCR System	Applied Biosystems Inc.
SterilGard Hood (LaminAir HB2427)	Hereaus
Thermoschüttler	Eppendorf
Tischzentrifuge 5414C	Eppendorf
Tischzentrifuge 5414C	Eppendorf
Tischzentrifuge 5702	Eppendorf
Tischzentrifuge 5702	Eppendorf
UV-Schirm (TFX-20M)	Life Technologies
Vivaspin500	Vivaspin
Vortex-2 Genie	Scientific Industries
Wasserbäder	Julabo
Zell-Kulturinkubatoren	Hereaus
Zentrifuge J2-HS	Beckmann
Zentrifuge J6-HC	Beckmann

6.2 Methoden

6.2.1 Standardmethoden der Molekularbiologie

Die nachfolgenden molekularbiologischen Methoden werden im einzelnen nicht besprochen da sie entweder den Standardprotokollen nach Sambrook *et al.* 2003 entsprechen oder gemäß Herstellerangaben durchgeführt wurden.

- Agarose Gelelektrophorese
- Annealing von Oligonukleotiden
- Auffüllreaktionen von überhängenden Enden (*Klenow Fill-in*; Promega)
- Aufreinigung von DNA nach Gelextraktion (Quiagen)
- Aufreinigung von DNA nach PCR (Quiagen)
- Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase
- DNase-Verdau
- Fällung von Nukleinsäuren für die Sequenzierung
- Kinasierung von 5'-DNA-Enden mit T₄ Polynukleotid Kinase (NEB)
- Klonierung in pGEMT (Promega)
- Ligation von DNA mit T₄ DNA Ligase (NEB)
- Midi-Präparation der Plasmid-DNA aus *E.coli* (Promega)
- Minilysat-Isolierung der Plasmid-DNA aus *E.coli* nach der Methode der alkalischen Lyse und mit Hilfe von ST-Puffer
- Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration
- Reverse Transkription mit reverser Transkriptase (Invitrogen)
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (NEB)
- Transformation von *E.coli* mit Hilfe von Calciumchlorid und Elektroporation

6.2.2 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der klonierten Sequenzen erfolgte nach der Didesoxynukleotidmethode nach Sanger (1977). Zur Durchführung der Sequenzreaktion wurden pro Ansatz ca. 500 ng/ μ l DNA zu 4 μ l Primer und 4 μ l Stopnukleotid-Mix (*ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*) gegeben und mit MQ-Wasser auf 10 μ l aufgefüllt. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler über 35 Zyklen nach folgendem Programm:

94°C / 10 sec. (Denaturierung)

56°C / 10 sec. (Annealing)

60°C / 4 min. (Elongation)

Die Auswertung der Fluoreszenzsignale erfolgte im ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer.

6.2.3 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation bzw. Analyse unterschiedlicher DNA-Sequenzen erfolgte in Thermocyclern vom Typ GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems). Die jeweils verwendeten PCR-Programme sind der u.a. Tabelle zu entnehmen.

6.2.3.1 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Zur Überprüfung der Expression verschiedener Gene in unterschiedlichen Zelllinien wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die verwendeten Primer hatten eine Schmelztemperatur zwischen 58°C und 62°C. Als Polymerase diente die *GoTaq*-Polymerase von Promega.

Reaktionsansatz		PCR-Programm		
cDNA	2 μ l	94°C	3 min	
RT-Primer-3'	5 μ l	94°C	30 sec	35 Zyklen
RT-Primer-5'	5 μ l	58°C	30 sec	

MgCl ₂	5 µl		
dNTPs	5 µl	72°C	3 min
5 x GoTaq-Puffer	10 µl	72°C	3 min
GoTaq	0,2 µl	4°C	∞
Wasser	14,8 µl		

6.2.3.2 Amplifikation von DNA-Konstrukten

Zur Amplifikation der u.a. Konstrukte wurden unterschiedliche Primer mit einer Mindestlänge von 30 Nukleotiden verwendet; als Template dienten entweder 293T-cDNA oder cDNA-Klone von *imagene*. Je nach Länge des Amplifikats wurde die GoTaq-Polymerase, oder bei Amplifikaten ab 5 kb aufgrund der Korrekturlesefähigkeit die PCR Extender Polymerase verwendet.

Reaktionsansatz		PCR-Programm		
cDNA	10 µl	94°C	3 min	
Primer-3'	10 µl	94°C	30 sec	
Primer-5'	10 µl	58-62°C (je	30 sec	
MgCl ₂	5 µl	nach Primer)		35 Zyklen
dNTPs	10 µl	72°C	3 min	
Puffer	q.s.	72°C	3 min	
Polymerase	0,2 µl	4°C	∞	
Wasser	ad 50 µl			

6.2.3.3 Quantitative PCR (*Real-time*PCR)

Die *Real-time* oder Quantitative PCR nutzt die Linearität der DNA-Amplifikation zur Bestimmung absoluter oder relativer Mengen an DNA einer bekannten Sequenz. Durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes als Reporter lassen sich diese Mengen messen. Der am häufigsten und auch hier verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist SYBR[®] Green I, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert. Als DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert er Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert es bei 522 nm. Die Fluoreszenz ist lediglich in der exponentiellen Phase proportional zur Menge doppelsträngigen DNA-Produktes. Zur Quantifizierung wurde die vergleichende CT-(cycle threshold) Methode ($2^{\Delta\Delta CT}$) angewendet, als Referenzgen diente GAPDH. Die Messung erfolgte im StepOnePlus[™] Real-Time PCR System von Applied Biosystems Inc.

Reaktionsansatz		PCR-Programm		
cDNA	0,8-2 µl	95 °C	10 min.	
Primer-3' (2 pmol/µl)	5 µl	95 °C	15 sec.	40 Zyklen
Primer-5' (2 pmol/µl)	5 µl	60 °C	1 min.	
2 x SYBR [®] Green PCR Master Mix	10 µl	95 °C 60 °C	15 sec. 1 min.	
Wasser	ad 20 µl	+ 0,5 °C bis 95 °C		

6.2.4 Standardmethoden der Zellbiologie

6.2.4.1 Transfektion mittels Polyethylenimin (PEI)

Bei der Transfektion mittels kationischer Polymere wurde Polyethylenimin verwendet. Hierzu wurden einen Tag vor der Transfektion ca. $5 \cdot 10^6$ Zellen (HEK293T) auf eine 15 cm dish mit rund 20 ml Medium ausgebracht. Etwa anderthalb Stunden vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Je nach Anzahl der zu transfizierenden Zellen erfolgte der Ansatz der Transfektions-Mischung folgendermaßen:

	Lösung A	Lösung B
6 cm dish (22,06 cm ²)	84 µl PEI/PBS	70 µl + 3,8 µg DNA
10 cm dish (56,75 cm ²)	180 µl PBS und 36 µl 10 mM PEI- Lösung = 216 µl	180 µl PBS und 10 µg DNA
15 cm dish (143,14 cm ²)	450 µl PBS und 90 µl 10 mM PEI- Lösung = 540 µl	450 µl PBS und 25 µg DNA
Zellkulturplatte (Blech)	1605 µl PBS und 321 µl 10 mM PEI- Lösung = 1926 µl	1605 µl PBS und 80 µg DNA

Das Verhältnis Polyethylenimin zu DNA betrug demnach 1:5. Unter ständigem Vortexen wurde Lösung B in Lösung A pipettiert und anschließend 15-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transfektionsmischung wurde gleichmäßig auf die Zellen verteilt, welche schließlich für die nächsten 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubierten.

6.2.4.2 Transfektion mittels Lipofektamin

Die Transfektion mittels Lipofektamin 2000™ erfolgte gemäß Herstellerangaben von life technologies™.

6.2.5 Standardmethoden der Proteinbiochemie

6.2.5.1 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die zur Herstellung der Minigele verwendete Acrylamidlösung bestand aus einer Mischung von Acrylamid und quervernetzendem Methylenbisacrylamid (30 % Acrylamid, 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid). Je nach zu erwartender Proteingröße wurden Gele mit Acrylamid-Konzentrationen zwischen 7,5 und 18 % gegossen, deren Zusammensetzungen der folgenden Tabelle zu entnehmen sind:

Material und Methoden

	7,5%	10%	12%	15%
Wasser	1,8 ml	1,4 ml	1,1 ml	0,55 ml
Trenngelpuffer	1,875 ml	1,875 ml	1,875 ml	1,875 ml
AA/BAA	1,25 ml	1,7 ml	2,0 ml	2,5 ml
10% SDS	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
APOD (10%)	25 μ l	25 μ l	25 μ l	25 μ l
TEMED	2,5 μ l	2,5 μ l	2,5 μ l	2,5 μ l

Als Radikalstarter dienten 20% Ammoniumperoxodisulfat (APOD) sowie als Katalysator N, N, N', N',-Tetramethylethylen-diamin (TEMED). Die Trenngele wurden mit 70 % Ethanol/-Isopropanol überschichtet, nach erfolgter Polymerisation wurde dieses wieder abgegossen und abschließend das Sammelgel hinzugegossen:

Sammelgel (4%)	
Wasser	2,2 ml
Sammelgelpuffer	0,375 ml
AA/BAA	0,39 ml
10% SDS	30 μ l
APOD (10%)	15 μ l
TEMED	3 μ l

6.2.5.2 Coomassie-Färbung

Zur Anfärbung der Proteine nach SDS-PAGE wurden die Gele für 20 Minuten in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Nach Entfernen der Färbelösung wurden die Gele mit Entfärbelösung oder Wasser bis zum gewünschten Ergebnis vorsichtig mehrmals gewaschen.

6.2.5.3 Western-Blot-Analyse

Der Proteintransfer erfolgte mittels Semi-Dry-Verfahren auf PVDF-Membrane für 1-1,25 h bei ca. 0,8 mA/cm² Membrane. Als Puffer dienten Anodenpuffer I und II sowie Kathodenpuffer. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Antikörper in 5 % BSA und 0,1 % Tween in TBS-Puffer verdünnt; der sich dem Blotten anschließende Blockierschritt erfolgte ebenfalls in 5 % BSA und 0,1 % Tween in TBS-Puffer für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Stuart Roller Mixer. Am darauffolgenden Tag wurden die Membrane drei Mal mit 0,1 % Tween₂₀ in TBS-Puffer gewaschen, bevor die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper (1:10 000 in 5 % BSA und 0,1 % Tween in TBS-Puffer) für 2-3 Stunden bei Raumtemperatur erfolgte.

Die Immundetektion erfolgte mittels Enhanced Chemilumineszenz (ECL). Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte erneut ein dreimaliger Waschschrift, bevor die Membrane mindestens eine Minute mit der Entwicklerlösung (Luminol:Peroxid 1:1) inkubiert wurde. Die durch die Meerrettichperoxidase vermittelte Chemilumineszenz konnte auf einem *Fuji* Röntgenfilm nachgewiesen werden.

6.2.5.4 Protein-Protein-Co-Immunopräzipitierung

48 Stunden nach erfolgter Transfektion wurden circa $1,5 \cdot 10^8$ HEK293T-Zellen (entspricht etwa 6 x 15cm dishes) in 0,6 ml Lysis-Puffer resuspendiert und eine Stunde bei 4°C rotiert. Nach einem 30 minütigen Zentrifugationsschritt (14.000 rpm) waren die gewünschten Proteine im Überstand enthalten, welchem anschließend zur Blockierung unspezifischer Bindungen 50 µl Protein G Agarose *Beads* hinzugegeben wurden. Der Überstand rotierte 20 Minuten bei 4° C, die *Beads* wurden bei 14.000 rpm 20 Minuten lang wieder abgetrennt.

Der Überstand wurde anschließend in Chromatographiesäulchen überführt und mit 5-10 µl des unverdünnten Antikörpers eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Über Nacht bei 4° C erfolgte die Bindung an 60 µl Protein G Agarose *Beads*.

Am darauffolgenden Tag wurde das Lysat bei 8000 rpm kurz abgetrennt und die verbliebenen *Beads* fünfmal mit DPBS gewaschen. Abschließend erfolgte der Elutionsschritt mit 60 µl Lämmli-Puffer nach einer fünfminütigen Inkubationszeit bei 14680 rpm. Zur Kontrolle der Präzipitationseffizienz wurden Lysat- und Durchflussproben genommen.

6.2.5.5 Spezifische Affinitätsaufreinigung an *Strep*-Tactin

Proteine, welche an das *Strep*-Tag gekoppelt waren, konnten über ihre spezifische Bindung an *Strep*-Tactin aufgereinigt werden. In kleinem Maßstab (d.h. 4-6 15 cm Ø Zellkulturschalen) erfolgte dies mittels *Strep*-Tactin-Suspension; sollten die Proteine anschließend massenspektrometrisch untersucht werden, erfolgte die Bindung an *Strep*-Tactin-Säulchen der Firma IBA GmbH; hierfür benötigte man zwischen 10-20 15 cm Ø Zellkulturschalen.

Aufreinigung mittels *Strep*-Tactin-Suspension

Die Gewinnung des Zelllysates erfolgte in analoger Weise zur Co-Immunopräzipitation. Zur Blockierung biotinylierter Proteine wurde der Überstand 20 Minuten bei 4° C mit 1 µl Avidin (10 µg/µl) inkubiert; dieses wurde anschließend 20 Minuten lang bei 14.000 rpm zentrifugiert.

Derweil wurden 150 µl *Strep*-Tactin-Suspension in kleinen Chromatographiesäulchen nacheinander mit 500 µl Waschpuffer sowie 500 µl Lysispuffer (ohne Zusätze) äquilibriert. Das Lysat wurde in die Säulchen gegeben und rotierte bei 4° C über Nacht. Am nächsten Tag wurde der Durchlauf abgetrennt und die Suspension 5 Mal mit je 700 µl Waschpuffer gewaschen. Zur Elution wurde 10 Minuten mit 60-120 µl Elutionspuffer (Buffer BE mit 10 mM Biotin) inkubiert, nachdem die erste Elution abzentrifugiert wurde, wurde dieser Schritt wiederholt, und schließlich erfolgte ein letzter Elutionsschritt mit Lämmli. Zur Überprüfung der Aufreinigung wurden von Lysat-, Durchlauf-, Waschschrift 1- und 5- sowie von allen drei Elutionen Proben genommen.

Aufreinigung mittels *Strep*-Tactin-Säulchen

Die Gewinnung des Lysates sowie die Blockierung mit Avidin erfolgte in analoger Weise zur Aufreinigung mittels *Strep*-Tactin-Suspension. Aufgrund der größeren Menge an Zellen ergab sich ein Gesamtvolumen an Lysat von bis zu 4 ml, welches mit Lysispuffer auf 6-7 ml verdünnt wurde. Zur Äquilibrierung der *Strep*-Tactin-Säulchen wurden zweimal 200 µl Waschpuffer durch die Säulchen laufen gelassen, bevor das Lysat ebenfalls zweimal die Säulchen durchlief. Anschließend erfolgten 5 Waschschriffe mit je 200 µl Waschpuffer; eluiert wurde mit 6 Mal mit je 100 µl 2 mM Biotin-Elutionspuffer.

In alle Elutionsfraktionen wurde Protease-Inhibitormix gegeben. Zur Überprüfung der Aufreinigung wurde von allen Fraktionen Proben genommen.

6.2.6 Massenspektrometrische Analyse der Proteine

6.2.6.1 Tryptischer In-Lösung-Verdau

Elutionen mit deutlichen Proteinsignalen wurden gepoolt und anschließend umgepuffert und aufkonzentriert. Hierzu wurden Vivaspin 500 Zentrifugalfiltereinheiten mit einem MWCO von 5000 verwendet. 100 µl der gesammelten Elutionsfraktionen wurde bei 4° C für 20-30 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert, anschließend wurden 250-300 µl Ammoniumbicarbonat bzw. Triethylammoniumbicarbonat (TEAB) hinzugegeben und dreimal bei 11000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Dies ergab rund 50 µl aufkonzentrierte Probe, die nicht durch den Filter geflossen war. Der Filter wurde noch mal mit 20 µl Puffer gespült welcher der Probe hinzugefügt wurde. Nach Reduzierung der Proben mit DTT-Lösung und Alkylierung mit IAA-Lösung für jeweils 1 h wurde der proteolytische Verdau durch Zugabe von 0,5 µg Trypsin (Sigma) bzw. 1,25 µg Elastase (entspricht einem Enzym-Substrat-Verhältnis von 1:20) gestartet und anschließend für 18 h bei 37°C (Trypsin) bzw. bei Raumtemperatur (Elastase) inkubiert. Das überschüssige IAA wurde vor dem Verdau mit DTT-Lösung abgefangen. Der Verdau wurde durch Zugabe von 1 µl Trifluoressigsäure (TFA) beendet.

6.2.6.2 Verwendung von den Crosslinkern BS³ und DTBP

Die beiden Crosslinker BS³ und DTBP wurden kurz vor der Verwendung frisch hergestellt, indem 10 mg davon in 350 µl Natriumphosphatlösung (25 mM, pH 7,4) gelöst wurden. Zu den zuvor erhaltenen Proteinlysaten wurde im Verhältnis 1:20 (Protein zu Crosslinker) die Crosslinkerlösung gegeben. Diese Mischung wurde für rund 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion mit Tris (20-50 mM) für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur beendet.

6.2.6.3 nanoLC-MALDI-MS/MS und Datenbanksuche

Aufbau und Einstellung der nanoLC, Konfiguration der Instrumente sowie Datenerfassung bzw. -bearbeitung erfolgten nach Rietschel et al. 2009.

Zum Abgleich der Massenspektren mit Datenbanken wurde die MASCOT™ Datenbank Suchmaschine v2.2.03 (Matrix Science Ltd., UK; Perkins et al., 1999) verwendet.

Es wurden sowohl eigene Datenbanken (mit zu erwartenden Protein-Interaktionspartnern) als auch die Datenbank Swissprot ausgewählt. Als Enzyme wurden Trypsin oder unspezifischer Verdau (für Elastase) eingestellt; als fixe Modifikation wurde die Carbamidomethylierung der Cysteine angegeben und als variable Modifikation die Methioninoxidation. Es wurde mit bis zu 2 überlesenen Schnittstellen („missed-cleavages“), einer Peptidmassentoleranz für den Precursor von 30 ppm und einer MS/MS-Toleranz von 0,5 Da für die Fragmente gesucht.

6.2.7 Spezielle Methoden in dieser Doktorarbeit

6.2.7.1 Klonierungsstrategien

Die Plasmide pcDNA3.1(-)-MLH1-ITGA9, pTRE2pur-ITGA9wt und pcDNA3.1(+)-MLH1wt wurden freundlicherweise von Dr. Angela Brieger und Dr. Claus Meyer zur Verfügung gestellt.

Konstrukt	Vektor	Template	Primer	Strategie	Vektorgröße	Insertgröße (mit Tag ^(*))	Proteingröße (mit Tag ^(*))
pEXPR-IBA103-MLH1-ITGA9	pEXPR-IBA103	pcDNA3.1(-)-MLH1-ITGA9	NheI-MLH1.F. und MLH1-ITGA9ΔKpnI	Nach Einfügen des Linkers ENKX PCR an pcDNA3.1(-)-MLH1-ITGA9, über NheI und KpnI in pEXPR-IBA103-ENKX kloniert	7813 bp	2304 bp (2436 bp)	85,9 kDa (90,2 kDa)
pEXPR-IBA105-MLH1-ITGA9	pEXPR-IBA105	pcDNA3.1(-)-MLH1-ITGA9	SacII-MLH1-3' und ITGA9-EcoRV-5'	PCR-Fragment MLH1-ITGA9 über SacII und EcoRV in pEXPR-IBA105 kloniert	7776 bp	2304 bp (2425 bp)	85,9 kDa (89,5 kDa)
pEXPR-IBA103-MLH1-ITGA9-EGFP	pEXPR-IBA103	pTarget-EGFP	EGFP-Sbfl-5' und EGFP-KpnI-5'	PCR-Fragment EGFP über KpnI und Sbfl in pEXPR-IBA103 und pEXPR-IBA103-MLH1-ITGA9 kloniert	8521 bp	2304 bp (3144 bp)	85,9 kDa (116,8 kDa)
pEXPR-IBA103-EGFP	pEXPR-IBA103	EGFP	EGFP-KpnI-5'	IBA103 und pEXPR-IBA103-MLH1-ITGA9 kloniert	6217 bp	717 bp (834 bp)	26,9 kDa (30,76 kDa)

Material und Methoden

pEXPR-IBA103- MLH1ΔITGA9	pEXPR- IBA103	pcDNA3.1(-)- MLH1·ITGA9	NheI-MLH1.F. und MLH1-KpnI	PCR-Fragment MLH1ΔITGA9 über NheI und KpnI in pEXPR- IBA103-ENKX kloniert	6547 bp	1038 bp (1170 bp)	38,4 kDa (42,8 kDa)
pEXPR-IBA103- ITGA9ΔMLH1	pEXPR- IBA103	pcDNA3.1(-)- MLH1·ITGA9	KpnI-ITGA9ΔM und ITGA9ΔM- XhoI	PCR-Fragment ITGA9ΔMLH1 über KpnI und XhoI in pEXPR- IBA103 kloniert	6778 bp	1269 bp (1395 bp)	47,6 kDa (51,8 kDa)
pEXPR-IBA103- MLH1·ITGA9ΔTMD	pEXPR- IBA103	pcDNA3.1(-)- MLH1·ITGA9	NheI-MLH1.F. und ITGA9ΔTMD-KpnI	PCR-Fragment MLH1·ITGA9ΔTMD über NheI und KpnI in pEXPR-IBA103- ENKX kloniert	7654 bp	2145 bp (2277 bp)	79,5 kDa (83,8 kDa)
pEXPR-IBA103-MLH1wt	pEXPR- IBA103	pcDNA3.1- (+)-MLH1wt	BamHI-MLH1 und Xho_MLH1ΔStop- 5'	PCR-Fragment MLH1wt über BamHI und XhoI in pEXPR- IBA103 kloniert	7789 bp	2271 bp (2397 bp)	84,6 kDa (88,9 kDa)
pEXPR-IBA103- ITGA9wt	pEXPR- IBA103	pTREpur- ITGA9wt	NotI-ITGA9wt und MLH1·ITGA9ΔKpnI	PCR-Fragment ITGA9wt über NotI und KpnI in pEXPR- IBA103 kloniert	8600 bp	3105 bp (3249 bp)	114,5 kDa (119 kDa)
pcDNA3.1(-)- MLH1·ITGA9_EGFP	pcDNA3.1- Zeo(-)	pTarget- EGFP	EGFP-mCherry*3 und EGFP-AfIII- NotI	PCR-Fragment EGFP über KpnI und AfIII in pcDNA3.1(-)- MLH1·ITGA9ΔStop kloniert (Primer: MLH1·ITGA9ΔKpnI)	7947 bp	2304 bp (3030 bp)	85,9 kDa (113 kDa)

Material und Methoden

pcDNA3.1(-)-EGFP	pcDNA3.1-Zeo(-)	-	-	MLH1·ITGA9 mit NheI und KpnI aus pcDNA3.1-MLH1·ITGA9-EGFP rausgeschnitten, Klenow-fill-in	5643 bp	717 bp	26,9 kDa
pcDNA3.1(-)-MLH1ΔITGA9_EGFP	pcDNA3.1-Zeo(-)	pcDNA3.1(-)-MLH1·ITGA9	NheI-MLH1.F. und MLH1-KpnI	MLH1·ITGA9-EGFP rausgeschnitten, PCR-Fragment MLH1ΔITGA9 über NheI und KpnI reinkloniert	6681 bp	1038 bp (1764 bp)	38,4 kDa (65,5 kDa)
pcDNA3.1(-)-ITGA9ΔMLH1_EGFP	pcDNA3.1-Zeo(-)	pcDNA3.1(-)-MLH1·ITGA9	KpnI-ITGA9ΔM und ITGA9ΔM-XhoI				47,6 kDa
pcDNA3.1(-)-MLH1·ITGA9ΔTMD_EGFP	pcDNA3.1-Zeo(-)	pcDNA3.1(-)-MLH1·ITGA9	NheI-MLH1.F. und ITGA9ΔTMD-KpnI	MLH1·ITGA9 mit NheI und KpnI aus pcDNA3.1-MLH1·ITGA9-EGFP rausgeschnitten, PCR-Fragment MLH1·ITGA9ΔTMD über NheI und KpnI	7788 bp	2145 bp (2871 bp)	79,5 kDa (106,6 kDa)

Material und Methoden

			reinkloniert				
pcDNA3.1(-)-MLH1wt_EGFP	pcDNA3.1-Zeo(-)	pcDNA3.1-(+)-MLH1wt	NheI-MLH1.F. und MLH1wt-KpnI-5'	MLH1-ITGA9 mit NheI und KpnI aus pcDNA3.1-MLH1-ITGA9-EGFP rausgeschnitten, PCR-Fragment MLH1wt über NheI und KpnI reinkloniert	7914 bp	2271 bp (2997 bp)	84,6 kDa (111,8 kDa)
pcDNA3.1(-)-BRCA1-C-flag	pcDNA3.1-Zeo(-)	imagene Klon	XhoI-BRCA1-C-3' und BRCA1-EcoRV / EcoRV-flag und Flag-HindIII	PCR-Fragment BRCA1-C über XhoI und EcoRV in pcDNA3.1-(-) kloniert, anschließend flag über EcoRV und HindIII	5924 bp	945 bp (978 bp)	35,4 kDa (36,6 kDa)
pcDNA3.1(-)-BRCA1-N-flag	pcDNA3.1-Zeo(-)	imagene Klon	XhoI-BRCA1 und BRCA1-N-EcoRV-5' / EcoRV-flag und Flag-HindIII	PCR-Fragment BRCA1-N über XhoI und EcoRV in pcDNA3.1-(-) kloniert, anschließend flag über EcoRV und HindIII	5672 bp	693 bp (726 bp)	26 kDa (27,3 kDa)
pcDNA3.1(-)-BRCA1p90-flag	pcDNA3.1-Zeo(-)	imagene Klon	XhoI-BRCA1-p90-3' und BRCA1-EcoRV	BRCA1-N aus pcDNA3.1(-)-BRCA1-N-flag rausgeschnitten, PCR-Fragment BRCA1p90 über XhoI und EcoRV reinkloniert	7433 bp	2454 bp (2487 bp)	90,5 kDa (91,8 kDa)

Material und Methoden

pcDNA3.1(-)-BRCA1p90-mCherry	pcDNA3.1-Zeo(-)	pTarget-mCherry	EcoRV-mCherry und mCherry-HindIII	Flag aus BRCA1p90 rausgeschnitten, über EcoRV und HindIII reinkloniert	8117 bp	2454 bp (3171 bp)	90,5 kDa (117,5 kDa)
pDsRed mit BRCA1-Linker	pDsRed1-N1	-	BRCA1-Linker-3'1 / BRCA1-Linker-3'2 / Alle 5 Oligos annealt, über BRCA1-Linker-3'3 / XhoI und AgeI in pDsRed1-N1 BRCA1-Linker-5'1 / kloniert BRCA1-Linker-5'2		4708 bp	-	-
pDsRed-BRCA1	pDsRed1-N1	imagene Klon	BRCA1a-AflIII-5' / SacI-BRCA1d-3' / BRCA1d-AgeI-5'	pDsRed1-N1 mit BRCA1- Linker AflIII/SacI geschnitten, mit BRCA1 a-c ligiert, anschließend BRCA1-d über SacI/AgeI kloniert	10236 bp	5603 bp (6285 bp)	220 kDa (234 kDa)
pDsRed-BRCA1-mCherry	pDsRed1-N1	pTarget-mCherry	AgeI-mCherry-3' und mCherry-NotI-5'	DsRed aus pDsRed1-N1 rausgeschnitten, PCR mCherry über AgeI und NotI kloniert	10261 bp	5603 bp (6309 bp)	220 kDa (234 kDa)

(*)Tag = EGFP / mCherry / Flag / Strep

6.2.7.2 Durchflusszytometrische Analysen

6.2.7.2.1 Indirekte durchflusszytometrische Analyse

Um Aussagen über eine eventuelle Orientierung des Fusionsproteins in der Zellmembran treffen zu können, sollten indirekte durchflusszytometrische Analysen zu Rate gezogen werden. Nach 24 h bzw. 48 h transienter Transfektion wurden ca. $5 \cdot 10^7$ Zellen in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Nach einem Fixationsschritt mit 4% Paraformaldehyd/PBS-Lösung wurden die Zellen entweder direkt mit Antikörper oder erst mit einem Detergens (Triton X-100) behandelt, um die Zellmembrane zu permeabilisieren. Nach Zugabe des Erstantikörpers (1:300 in 3% BSA/PBS) wurden die Zellen bei 4°C im Dunkeln über mindestens eine halbe Stunde inkubiert. Drei nachfolgende Waschschrte erfolgten 5 Minuten lang bei 8000 rpm, bevor der Fluorochrom-markierte Zweitantikörper für erneut mindestens eine halbe Stunde hinzugegeben wurde. Nach drei Waschschrten wurden die Zellen sofort durchflusszytometrisch analysiert.

6.2.7.2.2 PI Apoptose Assay

Der PI Apoptose Assay sollte einen Einfluss der verschiedenen Plasmide auf die Apoptoseresistenz untersuchen. Zu Beginn der Apoptoseinduktion wurden ca. $5 \cdot 10^6$ HEK 293T-Zellen in Ø10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Nach 24 h Kultivierungszeit erfolgte je nach Versuchsansatz die Behandlung mit 0-60 µM/ml Etoposid für 0-24 h. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurden die Zellen geschlachtet, mit PBS gewaschen, in PBS wieder resuspendiert und mit Propidiumiodid versetzt. Die Apoptoserate ergab sich aus dem Anteil im FL2-Kanal (580-600 nm) gemessenen FITC-positiven (entspricht Transfektions-positiven) Zellen. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt.

6.2.7.2.3 Lokalisationsstudien

6.2.7.2.3.1 Immunohistochemische Analysen

Bei der indirekten Fluoreszenzmikroskopie (IIF) werden Proteine in fixierten Zellen spezifisch mit einem Primärantikörper markiert und über einen fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, sichtbar gemacht. Ist das Protein bereits mit einem fluoreszierenden Protein wie GFP fusioniert, ist die Behandlung mit Antikörpern nicht nötig.

Zur Durchführung wurden transfizierte HEK 293T-Zellen 48 h auf Deckgläschen kultiviert. Um die Zellen zu fixieren, wurden sie nach Medientzug für 10 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd / PBS fixiert und nach einem Waschschriff mit 0,1 % TritonX-100 / PBS für weitere 10 Minuten permeabilisiert. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden wurde mindestens 1 Stunde mit 3 % BSA/PBS inkubiert und die Blockierlösung kurz mit PBS wieder entfernt. Sowohl der Primär- als auch der Sekundärantikörper wurden in einer 1:400-Verdünnung in 1 % BSA/PBS eingesetzt. Nach dem Blockierschritt inkubierten die Zellen mindestens 1 Stunde im Dunkeln mit Primärantikörperlösung in einer sog. „feuchten Kammer“. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, ebenfalls für mindestens 1 Stunde im Dunkeln in einer „feuchten Kammer“. Anschließend wurden die Zellen mindestens eine halbe Stunde in 1 % BSA/PBS gewaschen und für 15 Minuten mit DAPI-Lösung inkubiert. Nach einem letzten Waschschriff wurden die Deckgläser in Mowiol eingebettet, 3 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und bei 4 °C aufbewahrt.

6.2.7.2.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie beruht auf dem physikalischen Effekt der Fluoreszenz, bei dem fluoreszierende Stoffe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden und anschließend längerwelliges Licht emittieren. Die Anregungsstrahlung gelangt auf einen dichromatischen Teilerspiegel. Dieser reflektiert das Erregerlicht von kleiner Wellenlänge und ist gleichzeitig durchlässig für das längerwellige Licht der Emissionsstrahlung.

Die Anregungsstrahlung gelangt durch das Objektiv auf das Präparat und regt das Fluorochrom an, welches daraufhin längerwelliges Licht emittiert. Dieses passiert den dichromatischen Teilerspiegel und trifft auf den Ausgangssperrfilter (Emissionsfilter). Dieser filtert die gewünschte Emissionswellenlänge des Fluorochroms, das eigentliche Fluoreszenzbild. Das Fluoreszenzbild kann entweder durch das Okkular betrachtet oder mit einer Foto- oder Videokamera aufgezeichnet werden.

Die Zellen wurden nach Mediumentzug für 10 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd/PBS fixiert und mit 0,1 % TritonX-100/PBS-Lösung permeabilisiert. Anschließend folgte die DAPI-Färbung für 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank. Der Färbung folgte ein fünfminütiger Waschschrift mit 0,1 % TritonX-100/PBS-Lösung, einem Waschschrift 0,1 % TritonX-100/PBS/NaBH₄-Lösung und erneut einem Waschschrift mit 0,1 % TritonX-100/PBS-Lösung. Anschließend wurde überschüssige Lösung über einem Papiertuch abgestreift und die Deckgläser in Mowiol eingebettet, 3 Stunden lang bei Raumtemperatur getrocknet und bei 4 °C aufbewahrt.

6.2.7.2.3.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Beim Konfokalmikroskop handelt es sich um eine Weiterentwicklung des Fluoreszenzmikroskops. Hierbei wird das von einer Probe reflektierte oder emittierte Licht aus einer einzigen Ebene gesammelt. Eine konfokal zur Fokusebene angeordnete Lochblende (*pinhole*) sammelt ausschließlich das Licht, das vom Detektor erfasst wird. Befindet sich das Objekt nicht in der Fokusebene, ändert sich der reflektierte Lichtkegel mit der Folge, dass ein Teil des rückreflektierten Lichtes ausgeblendet wird; damit sinkt die Intensität am Detektor.

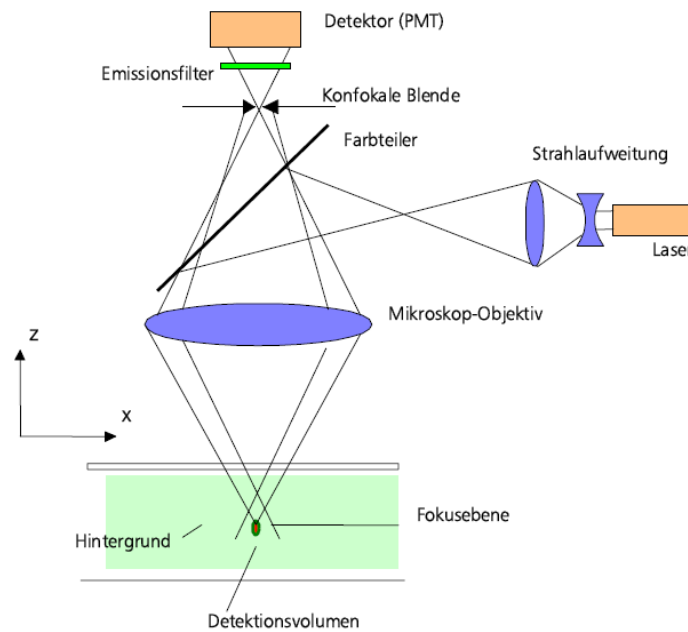


Abbildung 6-1: Prinzip eines konfokalen Laser Scanning-Mikroskops. Quelle: Zeiss

Beim Laser-Scanning Mikroskop wird ein Bild aus einer Menge von Daten zusammengesetzt, wobei die Probe Punkt für Punkt und Zeile für Zeile sequentiell abgetastet wird. Der so erzeugte optische Schnitt ist ein kontrastreiches in x , y und z hochaufgelöstes Abbild der Probe. Indem man die Fokusebene schrittweise verschiebt, lassen sich einzelne Bilder (optische Schnitte) zu einem dreidimensionalen Bildstapel zusammensetzen und anschließend digital verarbeiten. Proben, die am CLSM untersucht worden sind, wurden in gleicher Weise behandelt wie solche, die am Fluoreszenzmikroskop betrachtet wurden (siehe „Immunohistochemische Analyse“ und „Fluoreszenzmikroskopie“)

6.2.7.2.4 Zellmigrationstest

Bei einem Zellmigrationstest, auch „*Scratch Assay*“ genannt, wird eine künstliche „Wunde“ erzeugt, indem mit Hilfe einer Pipettenspitze eine konfluente Zellschicht aufgekratzt wird. Anschließend wird das Bestreben der Zellen pro Zeit beobachtet, die erzeugte Lücke wieder zu schließen. Das Migrationsverhalten wurde nach Lipofektion an der Zelllinie HEK 293T getestet. Nach 24, 36, 48 und 72 h wurden die Zellen fotografiert (3 Fotos pro Zelllinie und Probe) und der Zuwachs an migrierten Zellen durch Auszählen bestimmt und mit der Kontrolle (untransfizierte Zellen) verglichen.

6.2.7.2.5 Zelladhäsions-Assay

Zur Bestimmung der Zell-Zell-Adhäsionsfähigkeit wurde ein Zelladhäsions-Assay an den Zelllinien HEK 293T, HeLa, Sk-HEP, U2-OS, HCT116 nach erfolgreicher Lipofektion durchgeführt. Hierzu wurde eine 96-well-Platte mit MaxGel™ ECM Matrix (Sigma) (50µl/well) behandelt und bei 37°C 1 h inkubiert. Als Negativkontrolle blieben einige wells unbehandelt. Unspezifische Bindungen wurden 45-60 Minuten mit Blockierpuffer im Brutschrank bei 37°C blockiert. Nachdem einmal mit Waschpuffer gewaschen wurde, wurden 50 µl Zellsuspension ($4 \cdot 10^5$ Zellen/ml) in jedes well gegeben und erneut im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ für eine halbe Stunde inkubiert. Durch den nachfolgenden Zentrifugationsschritt (2000 rpm für 10-15 Sekunden) sollten nur die aggregierten Zellpartikel auf der Matrix verbleiben, während nicht aggregierte Zellen in den nachfolgenden Waschschrritten verloren gingen. Aggregierte Zellen wurden mit 4% Paraformaldehydlösung fixiert, kurz gewaschen, mit Kristallviolett gefärbt und getrocknet. Anschließend wurden die Kristalle durch eine 2-prozentige SDS-Lösung für 30 min gelöst. Die optische Dichte der adhärennten Zellen wurde bei 550nm gemessen.

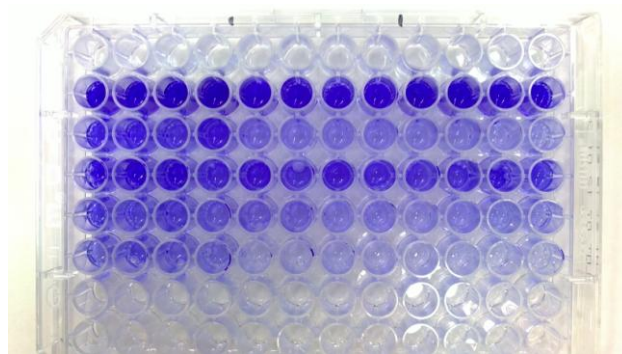


Abbildung 6-2: 96-well-Platte mit angefärbten Zellaggregaten

6.2.7.2.6 Focus Formation Assay

Kommerziell erhältliche MEF/3T3 (Tet-Off®, BD Clontech) Zellen wurden mit Hilfe von FUGENE 6 Transfektionsreagenz (Roche) stabil mit folgenden Plasmiden transfiziert: pTRE2puro-RAS, pTRE2puro-MLH1·ITGA9, pTRE2puro-MLH1^{ΔEx12-19} und pTRE2puro-ITGA9^{ΔEx1-16}.

Als Negativkontrolle dienten untransfizierte MEF/3T3-Zellen, selektioniert wurde nach 48 h mit 3 µg/ml Puromycin. Einzelklone wurden unter Selektionsdruck für rund 2 Wochen in Kultur gehalten und vermehrt und die Transkription des Transgens mit Hilfe von 10 µg/ml Doxycyclin unterdrückt. Die so erhaltenen Klone wurden auf kleine Zellkulturschalen (Ø 6 cm, $1 \cdot 10^4$ Zellen pro Schale) umgesetzt und in Ab- bzw. Anwesenheit von Doxycyclin für 2 bzw. 3 Wochen wachsen gelassen. Nachdem zweimal mit PBS gewaschen wurde, wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd/PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und mit 0,5% Kristallviolett in 25% Methanol ebenfalls für 10 Minuten bei Raumtemperatur bedeckt. Die Kristallviolettlösung wurde abgesaugt, die Zellen gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und schließlich über Nacht trocknen gelassen. Die Anwesenheit des Transgens wurde über Reverse-Transkriptions-PCR mit Hilfe folgender Primer überprüft:

RT-RAS-3': 5'-ATGACAGAATACAAGCTTGTGG-3'

RT-RAS-5': 5'-GCCAGGTCACACTTGTTGCCCA-3'

RT-MLH1-3': 5'-TGTGGATGTTAATGTGCA-3'

RT-ITGA9-5': 5'-TAGGGAGATGTTCTTCAC-3'

RT-MLH1 Δ IT-5': 5'-CTAACATCAGCTACTGTCTCTCC-3'

RT-IT Δ M-5': 5'-TCTGCACCACCAGATGAGAGTCGA-3'.

6.2.7.2.7 Zytotoxizitäts-Assay

Es sollten die relativen Überlebensraten von Hela-Zellen bestimmt werden, die zuvor mit verschiedenen Konstrukten transfiziert und anschließend mit 30 µM/ml Etoposid behandelt wurden. Hierzu wurden in 24-well-plates je $5 \cdot 10^4$ Zellen ausgebracht und über Lipofektion Leervektor (pcDNA_EGFP), MLH1·ITGA9, MLH1 Δ Ex12-19 und MLH1wt in die Zellen eingebracht. Die Messung erfolgte nach unterschiedlichen Zeitpunkten (3 h, 9 h, 24 h, 32 h, 48 und 57 h); hierzu wurden die Zellen erst mit PBS gewaschen und trypsiniert, mit PBS von der Platte abgelöst und abzentrifugiert (5 Minuten bei 1200 rpm), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 500 µl PBS wieder aufgenommen. Anschließend erfolgte die FACS-Analyse, nachdem jeweils 4 µl Propidiumiodid den Proben zugesetzt wurde.

6.2.7.2.8 PathScan Assay

Das kommerziell erhältliche PathScan® Multi-Target DNA Damage Kit (Cell Signaling) enthält 8 Primärantikörper, welche jeweils die aktivierte (phosphorylierte Form) von Proteinen erkennen, welche bei der Signalweiterleitung bei DNA-Schäden beteiligt sind. Folgende Antikörper kamen zum Einsatz: phospho-Histone H2A.X (Ser139) (20E3) Rabbit mAb, phospho-Chk1 (Ser345) (133D3) Rabbit mAb, phospho-Chk2 (Thr68) Antibody, phospho-p53 (Ser15) (16G8) Mouse mAb, p21 Waf1/Cip1 (12D1) Rabbit mAb, phospho-cdc2 (Tyr15) (10A11) Rabbit mAb, phospho p38 MAPK (Thr180/Tyr182), phosphor-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (G9) Mouse mAb (alle Cell Signaling). Die Durchführung erfolgte analog den Angaben des Herstellers. Dazu wurden $1,5 \cdot 10^4$ Zellen (MEF/tTA) pro *well* in eine 96-*well*-Platte ausgebracht und mit jeweils 30 μ M Etoposid behandelt. Die Zellen exprimierten MLH1·ITGA9, MLH1 Δ , MLH1wt oder blieben untransfiziert (Kontrollen). Nach 24 Stunden wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit 4% Paraformaldehyd/PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit PBS erfolgte ein einstündiger Blockierschritt (5% *goat*-Serum in 0,3% PBS/Triton X-100), bevor über Nacht bei 4°C der Primärantikörper inkubierte. Am nächsten Morgen folgte einem dreimaligen Waschschrift mit PBS eine 1-2 stündige Inkubation mit Fluorochrom-konjugiertem Zweitantikörper (*goat anti-mouse* IRDye 700 und *goat anti-rabbit* IRDye 800 (1:200; Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA, für Odyssey-Messung bzw. *goat anti-mouse* IgG-Rhodamin (sc-2092)/ *goat anti-rabbit* IgG-Phycoerythrin (sc-3739) (Santa Cruz) bei Messung im Tecan-Reader) bei Raumtemperatur im Dunkeln. Dieser wurde in drei hintereinanderfolgenden Waschschriften (PBS) wieder entfernt und die Platte sowohl im Mikroplatten-Reader (Tecan) als auch im Odyssey Imager bei 550 nm Extinktion/570 nm Emmision ausgewertet. Das Experiment wurde 3 mal durchgeführt.

7 Literaturverzeichnis

- Aaltonen LA, Peltomäki P., Mecklin JP., Järvinen H, Jass JR, Green JS et al., 1994. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposiscolorectal cancer patients. *Cancer Res*, 54, S.1645-8.
- Angeloni D., 2007. Molecular analysis of deletions in human chromosome 3p21 and the role of resident cancer genes in disease. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 6(1), S.19-39.
- Arribas J, Bech-Serra JJ, Santiago-Josefat B., 2006. ADAMs cell migration and cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 25, S.57–68.
- Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Lynch HT, Watson P, et al., 1996. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med*, 2, S.169-74.
- Bao S, Chang M-S, Auclair D, et al., 1999. HRad17, a human homologue of the *Schizosaccharomyces pombe* checkpoint gene rad17, is overexpressed in colon carcinoma. *Cancer Res*, 59, S.2023-2028.
- Barczyk M., Carracedo S., Gullberg D., 2010. Integrins. *Cell Tissue Res*, 339, S.269-280.
- Bellacosa A, Cicchillitti L, Schepis F, Riccio A, Yeung AT, Matsumoto Y, Golemis EA, Genuardi M, Neri G, 1999. MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(7), S.3969-74.
- Boland C., Thibodeau S., Hamilton S., 1998. A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*, 58, S.5248-57.
- Braga E, Loginov W, Khodyrev D, Pronina I, Kazubskaya T, Bogatyrova O, Kashuba VI, Senchenko VN, Klein G, Lerman MI, Kisselev LL, Zabarovsky ER., 2011. A novel MECA3 region in human 3p21.3 harboring putative tumor suppressor genes and oncogenes. *Exp Oncol*, 33(1), S.33-41.
- Brieger A, Adam R, Passmann S, Plotz G, Zeuzem S, Trojan J., 2011. A CRM1-dependent nuclear export pathway is involved in the regulation of MutL α subcellular localization. *Genes Chromosomes Cancer*, 50(2), S.59-70.
- Brieger A, Plotz G, Zeuzem S, Trojan J, 2007. Thymosin beta 4 expression and nuclear transport are regulated by hMLH1. *Biochem Biophys Res Commun*, 364, S.731–736.
- Brody LC, Biesecker BB, 1998. Breast cancer susceptibility genes. BRCA1 and BRCA2. *Medicine*, 77, S.208-226.

- Bronner, C. E., Baker, S. M., Morrison, P. T., Warren, G., Smith, L. G., Lescoe, M. K., Kane, M., Earabino, C., Lipford, J., Lindblom, A., Tannergard, P., Bollag, R. J., Godwin, A. R., Ward, D. C., Nordenskjold, M., Fishel, R., Kolodner, R., Liskay, R. M., 1994. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*, 368, S.258-261.
- Calderwood DA, 2004. Integrin activation. *J Cell Sci*, 117, S.657-666.
- Campbell ID, Humphries MJ., 2011. Integrin Structure, Activation, and Interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(3).
- Cannavo E, Gerrits B, Marra G, Schlapbach R, Jiricny J, 2007. Characterization of the interactome of the human MutL homologues MLH1, PMS1, and PMS2. *J Biol Chem*, 282(5), S.2976-86.
- Cardoso J, Molenaar L, de Menezes RX, et al., 2006. Chromosomal instability in MYH- and APC-mutant adenomatous polyps. *Cancer Res*, 66, S.2514-2519.
- Carmo-Fonseca, M, 2002. The contribution of nuclear compartmentalization to gene regulation. *Cell*, 108, S.513-521.
- de la Chapelle A, Hampel H., 2010. Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 28(20), S.3380-7.
- Chen C, Huang X, Atakilit A, Zhu QS, Corey SJ, Sheppard D., 2006. The Integrin α 9b1 Contributesto Granulopoiesis by Enhancing Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor Signaling. *Immunity*, 25(6), S.895-906.
- Chen C-F, Li S, Chen Y, Chen P-L, Sharp ZD & Lee W-H, 1996. The nuclear localization sequences of the BRCA1 protein interact with the importin-alpha subunit of the nuclear transport signal receptor. *J Biol Chem*, 271, S.32863-32868.
- Coene ED, Gadelha C, White N, Malhas A, Thomas B, Shaw M, Vaux DJ, 2011. A novel role for BRCA1 in regulating breast cancer cell spreading and motility. *J Cell Biol*, 192(3), S.497-512.
- Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen BA, Truta B, Sleisenger MH, Kim YS, 2004. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 10, S.191-195.
- Dherin C, Gueneau E, Francin M, Nunez M, Miron S, Liberti SE, Rasmussen LJ, Zinn-Justin S, Gilquin B, Charbonnier JB, Boiteux S, 2009. Characterization of a highly conserved binding site of Mlh1 required for exonuclease I-dependent mismatch repair. *Mol Cell Biol*, 29(3), S.907-18.
- Dizin E, Ray H, Suau F, Voeltzel T & Dalla Venezia N, 2008. Caspase-dependent BRCA1 cleavage facilitates chemotherapy-induced apoptosis. *Apoptosis*, 13, S.237- 246.

- Dohrn L., Salles D., Siehler S., Kaufmann J., Wiesmüller L., 2011. BRCA1-Mediated Repression of Mutagenic End-Joining of DNA Double-Strand Breaks Requires Complex Formation with BACH1. *Biochem J*, [Epub ahead of print].
- Drescher K., Sharma P., Lynch HT, 2010. Current Hypotheses on How Microsatellite Instability Leads to Enhanced Survival of Lynch Syndrome Patients. *Clin Dev Immunol.*, 2010(170432).
- Duckett DR, Bronstein SM, Taya Y and Modrich P, 1999. hMutSa- and hMutLa-dependent phosphorylation of p53 in response to DNA methylator damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, S.12384 - 12388.
- Duval A., Hamelin R., 2002. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res*, S.2447-2454.
- Fabbro M, Rodriguez JA, Baer R & Henderson BR, 2002. BARD1 induces BRCA1 intranuclear foci formation by increasing RING-dependent BRCA1 nuclear import and inhibiting BRCA1 nuclear export. *J Biol*, 277, S.21315–21324.
- Fearon ER., Vogelstein B., 1990. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*, 61, S.759-767.
- Felsher DW, Bishop JM., 1999. Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, S.3940-3944.
- Foray N, Marot D, Randrianarison V, Venezia ND, Picard D, Perricaudet M, Favaudon V and Jeggo P., 2002. Constitutive Association of BRCA1 and c-Abl and Its ATM-Dependent Disruption after Irradiation. *Mol Cell Biol*, 22, S.4020-4032.
- Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, Bennett LM, Haugen-Strano A, Swensen J, Miki Y, et al., 1994. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*, 266, S.120-122.
- Li, G., 2008. Mechanisms and functions of DNA repair. *Cell Research*, 18, S.85-98.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al., 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, 313, S.1960-1964.
- Gautier VW, Gu L, O'Donoghue N, Pennington S, Sheehy N, Hall WW, 2009. In vitro nuclear interactome of the HIV-1 Tat protein. *Retrovirology*, 6, S.47.
- Geary J., Sasieni P., Houlston R., Izatt L., Eeles R., Payne S., Fisher S., Hodgson S., 2008. Gene-related cancer spectrum in families with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). *Fam Cancer*, 7, S.163-172.
- Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA, et al., 1995. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*, 81, S.95-105.

- Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin Jr WG, Levrero M and Wang, 1999. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature*, 399, S.806 - 809.
- Görgens H., Hoffmann J., Schackert HK, Ebert M, 2007. Germline methylation of MLH1 causes hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC). *Chir Forum*, 36, S.77-78.
- Gowen LC, Avrutskaya AV, Latour AM, Koller BH, Leadon SA., 1998. BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage. *Science*, 281(5379), S.1009-12.
- Grady W., Carethers J., 2008. Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*, 135(4), S.1079-99.
- Greenberg RA, Sobhian B, Pathania S, Cantor SB, Nakatani Y, Livingston DM., 2006. Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes Dev*, 20(1), S.34-46.
- Guastadisegni C., 2010. Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: A meta-analysis of colorectal cancer survival data. *Eur J Cancer*, 46(15), S.2788-98.
- Gupta SK, Vlahakis NE., 2010. Integrin alpha5beta1: Unique signaling pathways reveal diverse biological roles. *Cell Adh Migr*, 4(2), S.194-8.
- Hall JM, Lee MK, Newman B, et al., 1990. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 250(4988), S.1684-9.
- Harkin, D.P. et al, 1999. Induction of GADD45 and JNK/SAPK-dependent apoptosis following inducible expression of BRCA1. *Cell*, 97, S.575-586.
- Hedge M, Roa B., 2009. Genetic Testing for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC). *Curr Protoc Hum Genet.*, 10.12.1-10.12.28.
- Hidaka M, Takagi Y, Takano TY, Sekiguchi M., 2005. PCNA-MutSalpha-mediated binding of MutLalpha to replicative DNA with mismatched bases to induce apoptosis in human cells. *Nucleic Acids Res*, 33, S.5703-5712.
- Huang, X.Z., Wu, J.F., Ferrando, R., Lee, J.H., Wang, Y.L., Farese, R.V., Jr., and Sheppard, D., 2000. Fatal bilateral chylothorax in mice lacking the integrin alpha5beta1. *Mol Cell Biol*, 20, S.5208-5215.
- Humphries MJ, Symonds EJ, Mould AP., 2003. Mapping functional residues onto integrin crystal structures. *Curr Opin Struct Biol*, 13(2), S.236-43.
- Iyer R., Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL., 2006. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev*, 106(2), S.302-23.

- Jiang J., Yang E., Jiang G., Nowsheen S., Wang H., Wang T., Wang Y., Billheimer D., Chakravarthy A., Brown M., Haffty B., Xia F., 2011. p53-Dependent BRCA1 Nuclear Export Controls Cellular Susceptibility to DNA Damage. *Cancer Res*, 71, S.5546.
- Jiricny J., 2006. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(5), S.335-46.
- Lee JO, Bankston LA, Arnaout MA, Liddington RC, 1995. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure*, 3, S.1333-1340.
- Kadyrov FA, Dzantiev L, Constantin N, Modrich P., 2006. Endonucleolytic function of MutL α in human mismatch repair. *Cell*, 126, S.297-308.
- Kanayama M, Morimoto J, Matsui Y, Ikesue M, Danzaki K, Kurotaki D, Ito K, Yoshida T, Uede T., 2011. $\alpha 9\beta 1$ Integrin-Mediated Signaling Serves as an Intrinsic Regulator of Pathogenic Th17 Cell Generation. *J Immunol*, [Epub ahead of print].
- Kashuba VI, Li J, Wang F, Senchenko VN, Protopopov A, Malyukova A, Kutsenko AS, Kadyrova E, Zabarovska VI, Muravenko OV, Zelenin AV, Kisselev LL, Kuzmin I, Minna JD, Winberg G, Ernberg I, Braga E, Lerman MI, Klein G, Zabarovsky ER., 2004. RBSP3 (HYA22) is a tumor suppressor gene implicated in major epithelial malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(14), S.4906-11.
- Katalinic et al., Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Available at: <http://www.gekid.de/> [Zugegriffen März 7, 2011].
- Kim WJ, Rajasekaran B, Brown KD., 2007. MLH1- and ATM-dependent MAPK signaling is activated through c-Abl in response to the alkylator N-methyl-N'-nitro-N'-nitrosoguanidine. *J Biol Chem*, 282(44), S.32021-31.
- Knudsen NO, Nielsen FC, Vinther L, et al., 2007. Nuclear localization of human DNA mismatch repair protein exonuclease 1 (hEXO1). *Nucl Acids Res*, 35, S.2609-2619.
- Kondo E., Horii A., Fukushige S., 2001. The interacting domains of three MutL heterodimers in man: hMLH1 interacts with 36 homologous amino acid residues within hMLH3, hPMS1 and hPMS2. *Nucl Acid Res*, 29(8), S.1695-1702.
- Kosinski J., Hinrichsen I., Bujnicki J., Friedhoff P., Plotz G., 2010. Identification of Lynch syndrome mutations in the MLH1-PMS2 interface that disturb dimerization and mismatch repair. *Hum Mutat*, 31(8), S.975-982.
- Kunkel T., Erie D., 2005. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem*, 74, S.681-710.
- Leong V., Lorenowicz J., Kozij N., Guarné A., 2009. Nuclear import of human MLH1, PMS2, and MutL: Redundancy is the key. *Mol Carcinog*, 48(8), S.742-50.
- Levinson G., Gutman G., 1987. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in Escherichia coli K-12. *Nucl Acid Res*, 15(13), S.5323-5338.

- Van Lier M., De Wilt J., Wagemakers J., Dinjens W., Damhuis R., Wagner A., Kuipers E. Van Leerdam M., 2009. Underutilization of microsatellite instability analysis in colorectal cancer patients at high risk for Lynch syndrome. *Scand J Gastroenterol.*, 44(5), S.600-4.
- Lindblom A., Tannergard P., Werelius B., Nordenskjöld M., 1993. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature Genet.*, 5, S.279-282.
- Linger RJ & Kruk PA, 2010. BRCA1 16 years later: risk-associated BRCA1 mutations and their functional implications. *FEBS J*, 277, S.3086–3096.
- Li LS, Morales JC, Hwang A, Wagner MW, Boothman DA, 2008. DNA Mismatch Repair-dependent Activation of c-Abl/p73aGADD45a-mediated Apoptosis. *J Biol Chem*, 283(31), S.21394-403.
- De Luca P., Vazquez E., Moiola C., Zalazar F., Cotignola J., Gueron G., Gardner K., De Siervi A., 2011. BRCA1 Loss Induces GADD153-Mediated Doxorubicin Resistance in Prostate Cancer. *Mol Cancer Res*, 9(1078).
- Lynch H., Lynch J., Attard T., 2009. Diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes: Lynch syndrome as a model. *CMAJ*, 181(5), S.273-80.
- Lynch HT, De la Chapelle A., 2003. Hereditary Colorectal Cancer. *N Engl J Med*, 348, S.919-32.
- Lynch HT, Krush AJ, 1971. Cancer Family „G“ revisited: 1895-1970. *Cancer*, 27(6), S.1505-1511.
- Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, et al., 1966. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med*, 117(2), S.206-12.
- Mac Partlin M, Homer E, Robinson H, McCormick CJ, Crouch DH, Durant ST, Matheson EC, Hall AG, Gillespie DA, Brown R, 2003. Interactions of the DNA mismatch repair proteins MLH1 and MSH2 with c-MYC and MAX. *Oncogene*, 22(6), S.819-25.
- Maniccia AW, Lewis C, Begum N, Xu J, Cui J, Chipitsyna G, Aysola K, Reddy V, Bhat G, Fujimura Y, Henderson B, Reddy ES, Rao VN., 2009. Mitochondrial localization, ELK-1 transcriptional regulation and growth inhibitory functions of BRCA1, BRCA1a, and BRCA1b proteins. *J Cell Physiol*, 219(3), S.634-41.
- Manke IA, Lowery DM, Nguyen A, Yaffe MB., 2003. BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. *Science*, 302, S.636-639.
- Martin SA & Ouchi T, 2005. BRCA1 phosphorylation regulates caspase-3 activation in UV-induced apoptosis. *Cancer Res*, 65, S.10657–10662.
- Maser RS, DePinho RA., 2002. Connecting chromosomes, crisis, and cancer. *Science*, 297, S.565-569.

- Mastrocola AS, Heinen CD, 2010. Nuclear reorganization of DNA mismatch repair proteins in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst.)*, 9(2), S.120-33.
- McKusick V., Kniffin C., 2011. OMIM Entry - #120435 - LYNCH SYNDROME I. Available at: <http://omim.org/entry/120435> [Zugegriffen Oktober 21, 2011].
- Mellon I, Rajpal DK, Koi M, Boland CR, Champe GN., 1996. Transcription-coupled repair deficiency and mutations in human mismatch repair genes. *Science*, 272(5261), S.557-60.
- Meyer C, Brieger A, Plotz G, Weber N, Passmann S, Dingermann T, Zeuzem S, Trojan J, Marschalek R., 2009. An interstitial deletion at 3p21.3 results in the genetic fusion of MLH1 and ITGA9 in a Lynch syndrome family. *Clin Cancer Res*, 15(3), S.762-9.
- Meyers M, Hwang A, Wagner MW, Bruening AJ, Veigl ML, Sedwick WD, Boothman DA., 2003. A role for DNA mismatch repair in sensing and responding to fluoropyrimidine damage. *Oncogene*, 22(47), S.7376-88.
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al., 1994. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 266, S.66-71.
- Minuth W., Strehl R., Schumacher K., 2003. Zukunftstechnologie Tissue Engineering: Von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe: Von Der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe 1. Aufl., Wiley-VCH Verlag GmbH Co. KGaA.
- Moldovan GL, D'Andrea AD., 2009. How the fanconi anemia pathway guards the genome. *Annu Rev Genet*, 43, S.223-49.
- Monteiro, A.N., 2000. BRCA1: exploring the links to transcription. *Trends Biochem*, 25, S.469-474.
- Morak M, Koehler U, Schackert HK, Steinke V, Royer-Pokora B, Schulmann K, Kloor M, Höchter W, Weingart J, Keiling C, Massdorf T, Holinski-Feder E; German HNPCC consortium., 2011. Biallelic MLH1 SNP cDNA expression or constitutional promoter methylation can hide genomic rearrangements causing Lynch syndrome. *J Med Genet*, 48(8), S.513-9.
- Moran A. & Ortega P., 2010. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol*, 2(3), S.151-158.
- Mukherjee S, Ridgeway AD, Lamb DJ, 2010. DNA mismatch repair and infertility. *Curr Opin Urol*, 20(6), S.525-32.
- Nakagawa H, Lockman JC, Frankel WL, et al., 2004. Mismatch repair gene PMS2: disease-causing germline mutations are frequent in patients whose tumors stain negative for PMS2 protein, but paralogous genes obscure mutation detection and interpretation. *Cancer Res*, 64(14), S.4721-7.

- Nielsen F.C., Jaeger A.C., Luetzen A., Bundgaard J.R., Rasmussen L.J., 2004. Characterization of human exonuclease 1 in complex with mismatch repair proteins, subcellular localization and association with PCNA. *Oncogene*, 23, S.1457-1468.
- Nyström-Lahti M., Sistonen P., Mecklin J.P., Pylkkänen L., Aaltonen L.A., Järvinen H., Weissenbach J., De la Chapelle A., Peltomäki P., 1994. Close linkage to chromosome 3p and conservation of ancestral founding haplotype in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, S.6054-6058.
- O'Brate A, Giannakakou P., 2003. The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resist Updat*, 6(6), S.313-22.
- Palmer, E.L., Ruegg, C., Ferrando, R., Pytela, R., and Sheppard, D., 1993. Sequence and tissue distribution of the integrin $\alpha 9$ subunit, a novel partner of $\beta 1$ that is widely distributed in epithelia and muscle. *J cell Biol*, 123, S.1289-1297.
- Papadopoulos, N., Nicolaidis, N. C., Wei, Y.-F., Ruben, S. M., Carter, K. C., Rosen, C. A., Haseltine, W. A., Fleischmann, R. D., Fraser, C. M., Adams, M. D., Venter, J. C., Hamilton, S. R., Petersen, G. M., Watson, P., Lynch, H. T., Peltomäki, P., Mecklin, J.-P., de la Chapelle, A., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., 1994. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*, 263, S.1625-1629.
- Peltomäki P., de la Chapelle A., 1997. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Adv Cancer Res*, 71, S.93-119.
- Peng M., Litman R., Xie J., Sharma S., Brosh R., Cantor S., 2007. The FANCD1/MutL α interaction is required for correction of the cross-link response in FA-J cells. *EMBO J*, 26(13), S.3238-3249.
- Pinheiro M, Pinto C, Peixoto A, Veiga I, Mesquita B, Henrique R, Baptista M, Fragoso M, Sousa O, Pereira H, Marinho C, Moreira Dias L, Teixeira MR., 2011. A novel exonic rearrangement affecting MLH1 and the contiguous LRRFIP2 is a founder mutation in Portuguese Lynch syndrome families. *Genet Med*, 13(10), S.895-902.
- Plotz G, Welsch C, Giron-Monzon L, Friedhoff P, Albrecht M, Piiper A, Biondi RM, Lengauer T, Zeuzem S, Raedle J., 2006. Mutations in the MutSa interaction interface of MLH1 can abolish DNA mismatch repair. *Nucl Acids Res*, 34(22), S.6574-86.
- Plotz, G., Raedle, J., Brieger, A., Trojan, J., Zeuzem, S., 2002. hMutS α forms an ATP-dependent complex with hMutL α and hMutL β on DNA. *Nucl Acid Res*, 30, S.711-718.
- Quaresima B, Faniello MC, Baudi F, Crugliano T, Cuda G, Costanzo F, Venuta S., 2006. In vitro analysis of genomic instability triggered by BRCA1 missense mutations. *Hum Mutat*, 27(7), S.715-24.
- Rajagopalan H, Jallepalli PV, Rago C, et al., 2004. Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature*, 428, S.77-81.

- Räschle M., Dufner P., Marra G., Jiricny J., 2002. Mutations within the hMLH1 and hPMS2 Subunits of the Human MutL α Mismatch Repair Factor Affect Its ATPase Activity, but Not Its Ability to Interact with hMutS α . *J Biol Chem*, 277, S.21810-21820.
- Raut C., Pawlik T., Rodriguez-Bias M., 2004. Clinicopathological features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res*, 568, S.275-282.
- Renz-Polster H., Krautzig S., 2011. *Basislehrbuch Innere Medizin* 4. Aufl., Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH.
- Rietschel B., Arrey T., Meyer B., Bornemann S., Schuerken M., Karas M., Poetsch A., 2009. Elastase Digests. *Mol Cell Proteomics*, 8(5), S.1029-1043.
- Rodriguez JA & Henderson BR, 2000. Identification of a functional nuclear export sequence in BRCA1. *J Biol Chem*, 275, S.38589-38596.
- Rodriguez, J.A., W.W. Au, and B.R. Henderson., 2004. Cytoplasmic mislocalization of BRCA1 caused by cancer-associated mutations in the BRCT domain. *Exp Cell Res*, 293, S.14-21.
- Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivastava S., 1997. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(23).
- Rotman G, Shiloh Y., 1998. ATM: from gene to function. *Hum Mol Genet*, 7, S.1555-1563.
- Roy S, Bingle L, Marshall JF, Bass R, Ellis V, Speight PM, Whawell SA., 2011. The role of $\alpha 9\beta 1$ integrin in modulating epithelial cell behaviour. *J Oral Pathol Med*, 40(10), S.755-61.
- Santucci-Darmanin S, Walpita D, Lespinasse F, Desnuelle C, Ashley T, Paquis-Flucklinger V, 2000. MSH4 acts in conjunction with MLH1 during mammalian meiosis. *FASEB J*, 14(11), S.1539-47.
- Santucci-Darmanin S, Walpita D, Lespinasse F, Desnuelle C, Ashley T, Paquis-Flucklinger V., 2000. MSH4 acts in conjunction with MLH1 during mammalian meiosis. *FASEB J*, 14, S.1539-1547.
- Schulmann K., Mangold E., Schmiegel W., Propping P., 2004. Wirksamkeit der Krebsfrüherkennung beimhereditären kolorektalenKarzinom ohne Polyposis. *Deutsches Ärzteblatt*, 101(8), S.506-512.
- Scully R, Ganesan S, Brown M, De Caprio JA, Cannistra SA, Feunteun J, Schnitt S & Livingston DM, 1996. Location of BRCA1 in human breast and ovarian cancer cells. *Science*, 272, S.123-125.
- Sen S, Zhou H, White RA, 1997. A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene*, 14, S.2195-2200.

- Senchenko VN, Liu J, Loginov W, Bazov I, Angeloni D, Seryogin Y, Ermilova V, Kazubskaya T, Garkavtseva R, Zabarovska VI, Kashuba VI, Kisselev LL, Minna JD, Lerman MI, Klein G, Braga EA, Zabarovsky ER., 2004. Discovery of frequent homozygous deletions in chromosome 3p21.3 LUCA and AP20 regions in renal, lung and breast carcinomas. *Oncogene*, 23(34), S.5719-28.
- Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH., 2010. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(4), S.288-300.
- Da Silva F., Valentin M., Ferreira F., Carraro D., Rossi B., 2009. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. *Sao Paulo Med J*, 127(1), S.46-51.
- Singh P., Reimer C., Peters J., Stepp MA., Hynes R., V.d.Water L., 2004. The spatial and temporal expression patterns of integrin $\alpha 9\beta 1$ and one of its ligands, the E11A segment of fibronectin, in cutaneous wound healing. *J Invest Derm*, 123, S.1176-1181.
- Skerra A., 2003. Das Strep-Tag als molekulares Werkzeug zur Hochdurchsatz-Proteinreinigung in der Proteomforschung. *Biospektrum*, 2, S.189-192.
- Smith L., 1998. Duplication of ATR inhibits MyoD, induces aneuploidy and eliminates radiation-induced G₁ arrest. *Nat Genet*, 19, S.39-46.
- Statistisches Bundesamt, 2009. Todesursachen in Deutschland. *Destatis*, 12(4).
- Stigliano V., Assisi D., Cosimelli M., Palmirotta R., Giannarelli D. et al., 2008. Survival of hereditary non-polyposis colorectal cancer patients compared with sporadic colorectal cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res*, 27(1), S.39.
- Storlazzi A, Gargano S, Ruprich-Robert G, Falque M, David M, Kleckner N, Zickler D., 2010. Recombination proteins mediate meiotic spatial chromosome organization and pairing. *Cell*, 141, S.94-106.
- Suhasini AN, Rawtani NA, Wu Y, Sommers JA, Sharma S, Mosedale G, North PS, Cantor SB, Hickson ID, Brosh RM, 2011. Interaction between the helicases genetically linked to Fanconi anemia group J and Bloom's syndrome. *EMBO J*, 30(4), S.692-705.
- Sun X., Ritzenthaler J., Wang K., Zhong X., White E., Han S., Roman J., 2011. Retraction. The fibronectin EDA splicing variant induces epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells through integrin $\alpha 9\beta 1$ -mediated activation of PI₃-K and Erk. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 300(1), S.150.
- Taooka Y, Chen J, Yednock T, Sheppard D., 1999. The integrin $\alpha 9\beta 1$ mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1. *J Cell Biol*, 145, S.413-420.
- Thangaraju M, Kaufmann SH, Couch FJ., 2000. BRCA1 facilitates stress-induced apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines. *J Biol Chem*, 275(43), S.33487-96.
- Thompson ME, 2010. BRCA1 16 years later: nuclear import and export processes. *FEBS J*, 277(15), S.3072-8.

- Tomer G., Buermeyer A., Nguyen M., Liskay R., 2002. Contribution of human Mlh1 and Pms2 ATPase activities to DNA mismatch repair. *J Biol Chem*, 277, S.21801-21809.
- Torre D., 1968. Multiple sebaceous tumors. *Arch Dermatol*, 98(5), S.549-51.
- Turcot J, Despres JP, St. Pierre F., 1959. Malignant tumors of the centralnervous system associates with familial polyposis of the colon:report of two cases. *Dis Colon Rectum*, 2, S.465-468.
- Umar A., Boland R., Terdiman J., Syngal S., de la Chapelle A., Rüschoff J., Fishel R., Lindo N., Burgart L., Hamelin R., Hamilton S., Hiatt R., Jass J., Lindblom A., Lynch H., Peltomaki P., Ramsey S., Rodriguez-Bigas M., Vasen H. et al, 2004. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(4).
- Vasen H., Plazzer J., Woods M., Peltomäki P., Sijmons R., MLH1 homepage - Colon cancer gene variant databases - Leiden Open Variation Database. Available at: http://chromium.liacs.nl/LOVD2/colon_cancer/home.php?select_db=MLH1 [Zugegriffen Oktober 26, 2011].
- Vasen H., Watson P., Mecklin JP., Lynch HT and the ICG-HNPCC, 1999. New Clinical Criteria for Hereditary Nonpolyposis ColorectalCancer (HNPCC, Lynch Syndrome) Proposed by the InternationalCollaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology*, 116, S.1453-1456.
- Veeravalli KK, Ponnala S, Chetty C, Tsung AJ, Gujrati M, Rao JS., 2012. Integrin $\alpha 9\beta 1$ -mediated cell migration in glioblastoma via SSAT and Kir4.2 potassium channel pathway. *Cell Signal*, 24(1), S.272-81.
- Vermeulen K., Van Bockstaele D., Berneman Z., 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation andtherapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*, 36, S.131-149.
- Vlahakis NE, Young BA, Atakilit A, Sheppard D., 2005. The lymphangiogenic vascular endothelial growth factors VEGF-C and -D are ligands for the integrin $\alpha 9\beta 1$. *J Biol Chem*, 280, S.4544-52.
- Wang H, Yang ES, Jiang J, Nowsheen S, Xia F., 2010. DNA damage-induced cytotoxicity is dissociated from BRCA1's DNA repair function but is dependent on its cytosolic accumulation. *Cancer Res*, 70(15), S.6258-67.
- Wang H, Yang ES, Jiang JH, Nowsheen S, Xia F, 2010. DNA damage-induced cytotoxicity is dissociated from BRCA1's DNA repair function but is dependent on its cytosolic accumulation. *Cancer Res*, 70, S.6258-6267.
- Wang Q, Zhang H, Guerrette S, Chen J, Mazurek A, Wilson T, Slupianek A, Skorski T, Fishel R, Greene MI., 2001. Adenosine nucleotide modulates the physical interaction between hMSH2 and BRCA1. *Oncogene*, 20(34), S.4640-9.

- Wang W, Luo BH., 2010. Structural basis of integrin transmembrane activation. *J Cell Biochem*, 109(3), S.447-52.
- Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J, 2000. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev*, 14(8), S.927-39.
- Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ, Qin J., 2000. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev*, 14(8), S.927-39.
- Wang, Y. & Qin, J., 2003. MSH2 and ATR form a signaling module and regulate two branches of the damage response to DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, S.15387–15392.
- Warthin Aldred S., 1913. Heredity with Reference to Carcinoma As Shown By the Study of the Cases Examined in the Pathological Laboratory Of the University of Michigan, 1895-1913. *Archives of Internal Medicine*, 12, S.546-555.
- Watson P., Riley B., 2005. The tumor spectrum in the Lynch syndrome. *Fam Cancer*, 4(3), S.245-8.
- Williams SA, Wilson JB, Clark AP, Mitson-Salazar A, Tomashevski A, Ananth S, Glazer PM, Semmes OJ, Bale AE, Jones NJ, Kupfer GM., 2011. Functional and physical interaction between the mismatch repair and FA-BRCA pathways. *Hum Mol Genet*, 20(22), S.4395-410.
- Wu W., Koike A, Takeshita T., Ohta T., 2008. The ubiquitin E3 ligase activity of BRCA1 and its biological functions. *Cell Div*, 3(1).
- Wu X, Platt JL, Cascalho M., 2003. Dimerization of MLH1 and PMS2 limits nuclear localization of MutL α . *Mol Cell Biol*, 23(9), S.3320-8.
- Wu Y, Berends MJ, Mensink RG, et al., 1999. Association of hereditary nonpolyposis colorectal cancer-related tumors displaying low microsatellite instability with MSH6 germline mutations. *Am J Hum Genet.*, 65(5), S.1291-8.
- Xie J, Litman R, Wang S, Peng M, Guillemette S, Rooney T, Cantor SB, 2010. Targeting the FANCD1-BRCA1 interaction promotes a switch from recombination to pol η -dependent bypass. *Oncogene*, 29(17), S.2499-508.
- Xie J., Litman R., Wang S., Peng M., Guillemette S., Rooney T., Cantor S., 2010. Targeting the FANCD1–BRCA1 interaction promotes a switch from recombination to pol η -dependent bypass. *Oncogene*, 29, S.2499-2508.
- Yamane K., Schupp J., Kinsella T., 2007. BRCA1 activates a G2-M Cell Cycle Checkpoint following 6-Thioguanine-induced DNA Mismatch Damage. *Cancer Res*, 67, S.6286-6292.

- Lee YH, Bedford M, Stallcup M., 2011. Regulated recruitment of tumor suppressor BRCA1 to the p21 gene by coactivator methylation. *Genes Dev*, 25, S.176-188.
- Yokosaki Y, Matsuura N, Higashiyama S, et al., 1998. Identification of the ligand binding site for the integrin $\alpha 5 \beta 1$ in the third fibronectin type repeat of tenascin-c. *J Biol Chem*, 273, S.11423-8.
- Young BA, Taooka Y, Liu S, Askins KJ, Yokosaki Y, Thomas SM, Sheppard D., 2001. The cytoplasmic domain of the integrin $\alpha 5$ subunit requires the adaptor protein paxillin to inhibit cell spreading but promotes cell migration in a paxillin-independent manner. *Mol Biol Cell*, 12(10), S.3214-25.
- Zhang H, Somasundaram K, Peng Y, Tian H, Zhang H, Bi D, Weber BL, El-Deiry WS., 1998. BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene*, 16(13), S.1713-21.
- Zhu N, Shao Y, Xu L, Yu L, Sun L., 2009. Gadd45-alpha and Gadd45-gamma utilize p38 and JNK signaling pathways to induce cell cycle G2/M arrest in Hep-G2 hepatoma cells. *Mol Biol Rep*, 36(8), S.2075-85.

8 Abkürzungsverzeichnis

%(v/v)	Volumenprozent
%(w/v)	Massenprozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
AC	Accession number (Proteine)
ad	Add up to
AFAP	Attenuierte Familiäre Adenomatöse Polyposis
APC	Adenomatous-polyposis-coli-(Protein)
APRG1	AP20 region gene 1
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related Protein
BASC	BRCA1-associated genome surveillance complex
BER	Basenexzisionsreparatur
BRCA1	Breast Cancer 1, early onset
BRCT	BRCA C-Terminus
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca.	Circa
cDNA	Complementary DNA
CHK1/2	Checkpoint kinase 1/2
CIN	Chromosomale Instabilität
CLSM	Konfokales Laserscanning-Mikroskop
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CS	Cowden Syndrom
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol

Abkürzungsverzeichnis

DCC	Deleted in colon cancer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dethiothreitol
e. V.	Eingetragener Verein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EU	Europäische Union
EXO ₁	Exonuklease 1
EZR	Extrazellularraum
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FJP	Familiäre juvenile Polyposis
g	Gramm
GOLGA ₄	Golgin subfamily A member 4
h	Stunde
HEK	Human embryonic kidney
HNPCC	Hereditary Non-Polyposis Cancer
Hrsg.	Herausgeber
IHC	Immunohistochemie
ITGA ₉	Integrin α ₉
ITGB ₁	Integrin β ₁
IZR	Interzellularraum
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
k-RAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KRK	Kolorektalkarzinom
kV	Kilovolt
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Flüssigchromatographie)
LDI	Long distance invers
LRRFIP ₂	Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2

Abkürzungsverzeichnis

mA	Milliampere
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MAP	MUTYH-assoziierte Polyposis
MCS	Multiple Klonierstelle
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MG	Molekulargewicht
ml	Milliliter
MLH1	mutL homolog 1
MLPA	Multiplex Ligation-dependent probe amplification
mM	Millimolar
MMR	<i>Mismatch</i> -Reparatur (Basenfehlreparatur)
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MSH2	mutS homolog 2
MSH6	mutS homolog 6
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NCI	National Cancer Institute
NER	Nukleotidexzisionreparatur
NES	Nukleäres Exportsignal
NHEJ	Nonhomologous end joining
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
PCNA	Proliferating cellular nuclear antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
PI	Isoelektrischer Punkt
PJS	Peutz-Jeghers-Syndrom
PMS1	Postmeiotic segregation increased 1
PMS2	Postmeiotic segregation increased 2
PXN	Paxillin
RFC	Replication factor C
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies

Abkürzungsverzeichnis

RPA	Replication protein A
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium</i> (Natrium-) dodecyl-Sulfat
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekunde
SRC	Src-Kinase
TBE	Tris-Borat EDTA
TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
tTA	Tetrazyklin-Transaktivator
wt	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

9 Anhang

9.1 Ergebnis-Listen der nLC-MALDI-MS/MS-Läufe

nLC-MALDI-MS/MS-Messungen der Negativkontrolle (IBA)

prot_hit_num	prot_acc	prot_desc	peptides
1	TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2	19
2	HSP71_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1 OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5	20
3	TBB2C_HUMAN	Tubulin beta-2C chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2C PE=1 SV=1	18
4	TBB2B_HUMAN	Tubulin beta-2B chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2B PE=1 SV=1	16
5	TBB4_HUMAN	Tubulin beta-4 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB4 PE=1 SV=2	15
6	HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1	14
7	TBB3_HUMAN	Tubulin beta-3 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB3 PE=1 SV=2	10
8	TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1B PE=1 SV=1	12
9	GRP78_HUMAN	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2	11
10	TBA1A_HUMAN	Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=1 SV=1	11
11	HSP76_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 6 OS=Homo sapiens GN=HSPA6 PE=1 SV=2	5
12	TBB6_HUMAN	Tubulin beta-6 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB6 PE=1 SV=1	8
13	HS71L_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1L OS=Homo sapiens GN=HSPA1L PE=1 SV=2	7
14	TBB8_HUMAN	Tubulin beta-8 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB8 PE=1 SV=2	8
15	TBA3C_HUMAN	Tubulin alpha-3C/D chain OS=Homo sapiens GN=TUBA3C PE=1 SV=3	8
16	Yl016_HUMAN	Putative tubulin beta chain-like protein ENSP00000290377 OS=Homo sapiens PE=5 SV=2	6
17	TBA8_HUMAN	Tubulin alpha-8 chain OS=Homo sapiens GN=TUBA8 PE=1 SV=1	6
18	HS90A_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5	12
19	EF1A1_HUMAN	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1	5
20	HS90B_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4	11
21	TBB1_HUMAN	Tubulin beta-1 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB1 PE=1 SV=1	4
22	ACTG_HUMAN	Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens GN=ACTG1 PE=1 SV=1	5

Anhang

23	GRP75_HUMAN	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=1 SV=2	3
24	EF1G_HUMAN	Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens GN=EEF1G PE=1 SV=3	4
25	PRDX1_HUMAN	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1	3
26	POTEF_HUMAN	POTE ankyrin domain family member F OS=Homo sapiens GN=POTEF PE=1 SV=2	3
27	EF2_HUMAN	Elongation factor 2 OS=Homo sapiens GN=EEF2 PE=1 SV=4	4
28	ACLY_HUMAN	ATP-citrate synthase OS=Homo sapiens GN=ACLY PE=1 SV=3	5
29	CH60_HUMAN	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2	4
30	ADT3_HUMAN	ADP/ATP translocase 3 OS=Homo sapiens GN=SLC25A6 PE=1 SV=4	2
31	ADT2_HUMAN	ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=6	2
32	ENPL_HUMAN	Endoplasmic reticulum protein OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1	4
33	G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3	1
34	PYR1_HUMAN	CAD protein OS=Homo sapiens GN=CAD PE=1 SV=3	2
35	PRDX4_HUMAN	Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens GN=PRDX4 PE=1 SV=1	2
36	TCPB_HUMAN	T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens GN=CCT2 PE=1 SV=4	2
37	PUR6_HUMAN	Multifunctional protein ADE2 OS=Homo sapiens GN=PAICS PE=1 SV=3	2
38	PDIA6_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens GN=PDIA6 PE=1 SV=1	3
39	PSB2_HUMAN	Proteasome subunit beta type-2 OS=Homo sapiens GN=PSMB2 PE=1 SV=1	1
40	SERA_HUMAN	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=PHGDH PE=1 SV=4	2
41	FAS_HUMAN	Fatty acid synthase OS=Homo sapiens GN=FASN PE=1 SV=2	4
42	ENOA_HUMAN	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2	1
43	H90B2_HUMAN	Putative heat shock protein HSP 90-beta 2 OS=Homo sapiens GN=HSP90AB2P PE=1 SV=2	2
44	CALX_HUMAN	Calnexin OS=Homo sapiens GN=CANX PE=1 SV=2	2
45	MIF_HUMAN	Macrophage migration inhibitory factor OS=Homo sapiens GN=MIF PE=1 SV=4	1
46	HNRH1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens GN=HNRNPH1 PE=1 SV=4	1
47	EF1B_HUMAN	Elongation factor 1-beta OS=Homo sapiens GN=EEF1B2 PE=1 SV=3	1
48	TRAP1_HUMAN	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TRAP1 PE=1 SV=3	1
49	TCPO_HUMAN	T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens GN=CCT8 PE=1 SV=4	2
50	TCPG_HUMAN	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Homo sapiens GN=CCT3 PE=1 SV=4	2
51	IMB1_HUMAN	Importin subunit beta-1 OS=Homo sapiens GN=KPNB1 PE=1 SV=2	1
52	KU70_HUMAN	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1 OS=Homo sapiens GN=XRCC6 PE=1 SV=2	1
53	ALDOA_HUMAN	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=1 SV=2	3

Anhang

54	TCPE_HUMAN	T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Homo sapiens GN=CCT5 PE=1 SV=1	1
55	ACTN4_HUMAN	Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens GN=ACTN4 PE=1 SV=2	2
56	C1QBP_HUMAN	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=C1QBP PE=1 SV=1	1
57	PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=2	2
58	ACTN1_HUMAN	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens GN=ACTN1 PE=1 SV=2	1
59	RUVB1_HUMAN	RuvB-like 1 OS=Homo sapiens GN=RUVBL1 PE=1 SV=1	1
60	HSP74_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo sapiens GN=HSPA4 PE=1 SV=4	1
61	NDKB_HUMAN	Nucleoside diphosphate kinase B OS=Homo sapiens GN=NME2 PE=1 SV=1	1
62	NDK8_HUMAN	Putative nucleoside diphosphate kinase OS=Homo sapiens GN=NME2P1 PE=5 SV=1	1
63	ATX2L_HUMAN	Ataxin-2-like protein OS=Homo sapiens GN=ATXN2L PE=1 SV=2	1
64	4F2_HUMAN	4F2 cell-surface antigen heavy chain OS=Homo sapiens GN=SLC3A2 PE=1 SV=2	2
65	IF4A3_HUMAN	Eukaryotic initiation factor 4A-III OS=Homo sapiens GN=EIF4A3 PE=1 SV=4	1
66	PRDX3_HUMAN	Thioredoxin-dependent peroxide reductase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PRDX3 PE=1 SV=3	1
67	KCRB_HUMAN	Creatine kinase B-type OS=Homo sapiens GN=CKB PE=1 SV=1	2
68	PRDX2_HUMAN	Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens GN=PRDX2 PE=1 SV=5	2
69	NPM_HUMAN	Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 PE=1 SV=2	2
70	CC157_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 157 OS=Homo sapiens GN=CCDC157 PE=2 SV=2	1
71	MYH14_HUMAN	Myosin-14 OS=Homo sapiens GN=MYH14 PE=1 SV=1	1
72	DHE3_HUMAN	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GLUD1 PE=1 SV=2	2
73	PDIA3_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDIA3 PE=1 SV=4	1
74	CH10_HUMAN	10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPE1 PE=1 SV=2	1
75	RAB3C_HUMAN	Ras-related protein Rab-3C OS=Homo sapiens GN=RAB3C PE=2 SV=1	1
76	RB33B_HUMAN	Ras-related protein Rab-33B OS=Homo sapiens GN=RAB33B PE=1 SV=1	1
77	RAB6A_HUMAN	Ras-related protein Rab-6A OS=Homo sapiens GN=RAB6A PE=1 SV=3	1
78	RAB4B_HUMAN	Ras-related protein Rab-4B OS=Homo sapiens GN=RAB4B PE=1 SV=1	1
79	RAB15_HUMAN	Ras-related protein Rab-15 OS=Homo sapiens GN=RAB15 PE=1 SV=1	1
80	NP1L1_HUMAN	Nucleosome assembly protein 1-like 1 OS=Homo sapiens GN=NAP1L1 PE=1 SV=1	1
81	CLH1_HUMAN	Clathrin heavy chain 1 OS=Homo sapiens GN=CLTC PE=1 SV=5	1
82	CALM_HUMAN	Calmodulin OS=Homo sapiens GN=CALM1 PE=1 SV=2	1
83	HYOU1_HUMAN	Hypoxia up-regulated protein 1 OS=Homo sapiens GN=HYOU1 PE=1 SV=1	1

Anhang

84	PYC_HUMAN	Pyruvate carboxylase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PC PE=1 SV=2	2
85	XPP3_HUMAN	Probable Xaa-Pro aminopeptidase 3 OS=Homo sapiens GN=XPNPEP3 PE=1 SV=1	1
86	1433E_HUMAN	14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens GN=YWHAE PE=1 SV=1	1
87	XPOT_HUMAN	Exportin-T OS=Homo sapiens GN=XPOT PE=1 SV=2	1
88	ATPA_HUMAN	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5A1 PE=1 SV=1	1
89	RAN_HUMAN	GTP-binding nuclear protein Ran OS=Homo sapiens GN=RAN PE=1 SV=3	1
90	PSMD3_HUMAN	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 OS=Homo sapiens GN=PSMD3 PE=1 SV=2	1
91	NMD3A_HUMAN	Glutamate [NMDA] receptor subunit 3A OS=Homo sapiens GN=GRIN3A PE=1 SV=2	1
92	RANG_HUMAN	Ran-specific GTPase-activating protein OS=Homo sapiens GN=RANBP1 PE=1 SV=1	1
93	RUXE_HUMAN	Small nuclear ribonucleoprotein E OS=Homo sapiens GN=SNRPE PE=1 SV=1	1
94	S2542_HUMAN	Solute carrier family 25 member 42 OS=Homo sapiens GN=SLC25A42 PE=1 SV=2	1
95	PSME3_HUMAN	Proteasome activator complex subunit 3 OS=Homo sapiens GN=PSME3 PE=1 SV=1	1
96	TERA_HUMAN	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sapiens GN=VCP PE=1 SV=4	1
97	ATPK_HUMAN	ATP synthase subunit f, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATP5J2 PE=1 SV=3	1
98	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=5	1
99	TCPZ_HUMAN	T-complex protein 1 subunit zeta OS=Homo sapiens GN=CCT6A PE=1 SV=3	1
100	GCN1L_HUMAN	Translational activator GCN1 OS=Homo sapiens GN=GCN1L1 PE=1 SV=5	1
101	Ko284_HUMAN	Protein KIAA0284 OS=Homo sapiens GN=KIAA0284 PE=1 SV=4	1
102	PRKDC_HUMAN	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=PRKDC PE=1 SV=3	1
103	PGAM1_HUMAN	Phosphoglycerate mutase 1 OS=Homo sapiens GN=PGAM1 PE=1 SV=2	1
104	TBCD4_HUMAN	TBC1 domain family member 4 OS=Homo sapiens GN=TBC1D4 PE=1 SV=2	1
105	PSA1_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-1 OS=Homo sapiens GN=PSMA1 PE=1 SV=1	1
106	M4K4_HUMAN	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4 OS=Homo sapiens GN=MAP4K4 PE=1 SV=2	1
107	TNIK_HUMAN	TRAF2 and NCK-interacting protein kinase OS=Homo sapiens GN=TNIK PE=1 SV=1	1
108	CORO6_HUMAN	Coronin-6 OS=Homo sapiens GN=CORO6 PE=2 SV=2	1
109	PRDBP_HUMAN	Protein kinase C delta-binding protein OS=Homo sapiens GN=PRKCDPB PE=1 SV=2	1
110	TRM44_HUMAN	Probable tRNA (uracil-O(2)-)-methyltransferase OS=Homo sapiens GN=C4orf23 PE=2 SV=2	1
111	ARMC5_HUMAN	Armadillo repeat-containing protein 5 OS=Homo sapiens GN=ARMC5 PE=2 SV=2	1
113	UBA6_HUMAN	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6 OS=Homo	1

Anhang

sapiens GN=UBA6 PE=1 SV=1			
115	AKNA_HUMAN	AT-hook-containing transcription factor OS=Homo sapiens GN=AKNA PE=1 SV=2	1
116	CSK2B_HUMAN	Casein kinase II subunit beta OS=Homo sapiens GN=CSNK2B PE=1 SV=1	1

nLC-MALDI-MS/MS-Messungen des Fusionsproteins MLH1-ITGA9 (Ambic)

prot_hit_num	prot_acc	prot_desc	peptides
1	HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1	14
2	HSP71_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1 OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5	12
3	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1	11
4	GRP78_HUMAN	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2	8
5	TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1B PE=1 SV=1	8
6	HSP76_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 6 OS=Homo sapiens GN=HSPA6 PE=1 SV=2	5
7	TBB2C_HUMAN	Tubulin beta-2C chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2C PE=1 SV=1	9
8	ACTC_HUMAN	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens GN=ACTC1 PE=1 SV=1	8
9	HSP72_HUMAN	Heat shock-related 70 kDa protein 2 OS=Homo sapiens GN=HSPA2 PE=1 SV=1	5
10	TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2	9
11	TBB2A_HUMAN	Tubulin beta-2A chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2A PE=1 SV=1	7
12	TBB3_HUMAN	Tubulin beta-3 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB3 PE=1 SV=2	6
13	HS90B_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4	8
14	TBA3C_HUMAN	Tubulin alpha-3C/D chain OS=Homo sapiens GN=TUBA3C PE=1 SV=3	5
15	POTEE_HUMAN	POTE ankyrin domain family member E OS=Homo sapiens GN=POTEE PE=1 SV=3	4
16	PYC_HUMAN	Pyruvate carboxylase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PC PE=1 SV=2	9
17	TBA8_HUMAN	Tubulin alpha-8 chain OS=Homo sapiens GN=TUBA8 PE=1 SV=1	5
18	ACTN4_HUMAN	Alpha-actinin-4 OS=Homo sapiens GN=ACTN4 PE=1 SV=2	7
19	ACTBL_HUMAN	Beta-actin-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=ACTBL2 PE=1 SV=2	5
20	TBB4_HUMAN	Tubulin beta-4 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB4 PE=1 SV=2	6
21	ACTN1_HUMAN	Alpha-actinin-1 OS=Homo sapiens GN=ACTN1 PE=1 SV=2	5
22	ACTBM_HUMAN	Beta-actin-like protein 3 OS=Homo sapiens GN=ACTBL3 PE=1 SV=1	3
23	PCCA_HUMAN	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PCCA PE=1 SV=3	3
24	TCPO_HUMAN	T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens GN=CCT8 PE=1 SV=4	2

Anhang

25	PCCB_HUMAN	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PCCB PE=1 SV=3	3
26	TBB8_HUMAN	Tubulin beta-8 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB8 PE=1 SV=2	4
27	GRP75_HUMAN	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=1 SV=2	2
28	HS90A_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5	4
29	TBB4Q_HUMAN	Putative tubulin beta-4q chain OS=Homo sapiens GN=TUBB4Q PE=5 SV=1	3
30	TBB6_HUMAN	Tubulin beta-6 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB6 PE=1 SV=1	3
31	PRDX1_HUMAN	Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1	3
32	TCPG_HUMAN	T-complex protein 1 subunit gamma OS=Homo sapiens GN=CCT3 PE=1 SV=4	4
33	PRDX4_HUMAN	Peroxiredoxin-4 OS=Homo sapiens GN=PRDX4 PE=1 SV=1	1
34	EF1A1_HUMAN	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1	2
35	MCCB_HUMAN	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MCCC2 PE=1 SV=1	2
36	TERA_HUMAN	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Homo sapiens GN=VCP PE=1 SV=4	2
37	FAS_HUMAN	Fatty acid synthase OS=Homo sapiens GN=FASN PE=1 SV=2	2
38	TRAP1_HUMAN	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=TRAP1 PE=1 SV=3	1
39	ATX2L_HUMAN	Ataxin-2-like protein OS=Homo sapiens GN=ATXN2L PE=1 SV=2	1
40	ACLY_HUMAN	ATP-citrate synthase OS=Homo sapiens GN=ACLY PE=1 SV=3	3
41	EF1G_HUMAN	Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens GN=EEF1G PE=1 SV=3	3
42	H90B3_HUMAN	Putative heat shock protein HSP 90-beta-3 OS=Homo sapiens GN=HSP90AB3P PE=5 SV=1	1
43	EF1B_HUMAN	Elongation factor 1-beta OS=Homo sapiens GN=EEF1B2 PE=1 SV=3	1
44	G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=GAPDH PE=1 SV=3	1
45	PIMT_HUMAN	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase OS=Homo sapiens GN=PCMT1 PE=1 SV=3	1
46	ITA9_HUMAN	Integrin alpha-9 OS=Homo sapiens GN=ITGA9 PE=1 SV=2	1
47	PSA1_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-1 OS=Homo sapiens GN=PSMA1 PE=1 SV=1	1
48	PDIA6_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A6 OS=Homo sapiens GN=PDIA6 PE=1 SV=1	1
49	TCPB_HUMAN	T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens GN=CCT2 PE=1 SV=4	2
50	PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=2	1
51	SERA_HUMAN	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=PHGDH PE=1 SV=4	1
52	CALX_HUMAN	Calnexin OS=Homo sapiens GN=CANX PE=1 SV=2	1
53	TCPA_HUMAN	T-complex protein 1 subunit alpha OS=Homo sapiens GN=CCT1 PE=1 SV=1	2
54	CH60_HUMAN	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2	1

Anhang

55	PSD13_HUMAN	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13 OS=Homo sapiens GN=PSMD13 PE=1 SV=1	1
56	PRDX2_HUMAN	Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens GN=PRDX2 PE=1 SV=5	2
57	NPM_HUMAN	Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 PE=1 SV=2	2
58	ENPL_HUMAN	Endoplasmin OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1	1
59	ACTN2_HUMAN	Alpha-actinin-2 OS=Homo sapiens GN=ACTN2 PE=1 SV=1	2
60	1433E_HUMAN	14-3-3 protein epsilon OS=Homo sapiens GN=YWHAE PE=1 SV=1	1
61	KLKB1_HUMAN	Plasma kallikrein OS=Homo sapiens GN=KLKB1 PE=1 SV=1	1
62	ALDOA_HUMAN	Fructose-bisphosphate aldolase A OS=Homo sapiens GN=ALDOA PE=1 SV=2	1
63	ENOA_HUMAN	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2	1
64	TCPE_HUMAN	T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Homo sapiens GN=CCT5 PE=1 SV=1	1
65	TPIS_HUMAN	Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TPI1 PE=1 SV=2	1
68	M4K4_HUMAN	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 OS=Homo sapiens GN=MAP4K4 PE=1 SV=2	1
69	TNIK_HUMAN	TRAF2 and NCK-interacting protein kinase OS=Homo sapiens GN=TNIK PE=1 SV=1	1

nLC-MALDI-MS/MS-Messungen des Fusionsproteins MLH1-ITGA9 (TEAB)

prot_hit_num	prot_acc	prot_desc	peptides
1	HSP71_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1 OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5	26
2	HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1	21
3	HS71L_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1L OS=Homo sapiens GN=HSPA1L PE=2 SV=2	13
4	MLH1_HUMAN	DNA mismatch repair protein Mlh1 OS=Homo sapiens GN=MLH1 PE=1 SV=1	12
5	TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2	11
6	HSP76_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 6 OS=Homo sapiens GN=HSPA6 PE=1 SV=2	7
7	ITA9_HUMAN	Integrin alpha-9 OS=Homo sapiens GN=ITGA9 PE=1 SV=1	12
8	TBB2C_HUMAN	Tubulin beta-2C chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2C PE=1 SV=1	9
9	TBA1A_HUMAN	Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=1 SV=1	10
10	TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1B PE=1 SV=1	10
11	GRP75_HUMAN	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=1 SV=2	6
12	GRP78_HUMAN	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2	6
13	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1	5
14	EF1A3_HUMAN	Putative elongation factor 1-alpha-like 3 OS=Homo sapiens GN=EEF1AL3 PE=5 SV=1	3
15	ACTC_HUMAN	Actin, alpha cardiac muscle 1 OS=Homo sapiens GN=ACTC1 PE=1 SV=1	4
16	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=5	2

Anhang

17	ADT2_HUMAN	ADP/ATP translocase 2 OS=Homo sapiens GN=SLC25A5 PE=1 SV=6	3
18	STUB1_HUMAN	STIP1 homology and U box-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=STUB1 PE=1 SV=2	1
19	HSP74_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo sapiens GN=HSPA4 PE=1 SV=4	1
20	ELA1_HUMAN	Elastase-1 OS=Homo sapiens GN=ELA1 PE=2 SV=2	1
21	COR1C_HUMAN	Coronin-1C OS=Homo sapiens GN=CORO1C PE=1 SV=1	1
22	UBIQ_HUMAN	Ubiquitin OS=Homo sapiens GN=RPS27A PE=1 SV=1	1
23	DDX6_HUMAN	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 OS=Homo sapiens GN=DDX6 PE=1 SV=2	1
24	HS105_HUMAN	Heat shock protein 105 kDa OS=Homo sapiens GN=HSPH1 PE=1 SV=1	1
25	HS90B_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=HSP90AB1 PE=1 SV=4	1
36	CYC_HUMAN	Cytochrome c OS=Homo sapiens GN=CYCS PE=1 SV=2	1

nLC-MALDI-MS/MS-Messungen des Fusionsproteins MLH1-ITGA9 (Trypsin+TEAB)

prot_hit_num	prot_acc	prot_desc	peptides
1	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1	3
2	MIF_HUMAN	Macrophage migration inhibitory factor OS=Homo sapiens GN=MIF PE=1 SV=4	3
3	TBA1A_HUMAN	Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=1 SV=1	2
4	HSP71_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1 OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5	2
5	MLH1_HUMAN	DNA mismatch repair protein Mlh1 OS=Homo sapiens GN=MLH1 PE=1 SV=1	2
6	ACTA_HUMAN	Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens GN=ACTA2 PE=1 SV=1	1

nLC-MALDI-MS/MS-Messungen des Fusionsproteins MLH1-ITGA9 (Elastase+TEAB)

prot_hit_num	prot_acc	prot_desc	peptides
1	MLH1_HUMAN	DNA mismatch repair protein Mlh1 OS=Homo sapiens GN=MLH1 PE=1 SV=1	49
2	HSP71_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1 OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5	19
3	HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1	19
4	TBA1A_HUMAN	Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=1 SV=1	16
5	ATX2L_HUMAN	Ataxin-2-like protein OS=Homo sapiens GN=ATXN2L PE=1 SV=2	9
6	TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2	8
7	HSP72_HUMAN	Heat shock-related 70 kDa protein 2 OS=Homo sapiens GN=HSPA2 PE=1 SV=1	10
8	MIF_HUMAN	Macrophage migration inhibitory factor OS=Homo sapiens GN=MIF PE=1 SV=4	10
9	CELA1_HUMAN	Chymotrypsin-like elastase family member 1 OS=Homo sapiens GN=CELA1 PE=2 SV=2	10
10	SET_HUMAN	Protein SET OS=Homo sapiens GN=SET PE=1 SV=3	3
11	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1	3

Anhang

12	EF1A1_HUMAN	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1	4
13	GRP78_HUMAN	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2	3
14	K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	1
15	KCRB_HUMAN	Creatine kinase B-type OS=Homo sapiens GN=CKB PE=1 SV=1	2
16	H90B3_HUMAN	Putative heat shock protein HSP 90-beta-3 OS=Homo sapiens GN=HSP90AB3P PE=5 SV=1	1
17	GRP75_HUMAN	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=1 SV=2	2
18	HS90A_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5	2
19	PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=2	1
20	CALR_HUMAN	Calreticulin OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1	1
21	NDKB_HUMAN	Nucleoside diphosphate kinase B OS=Homo sapiens GN=NME2 PE=1 SV=1	1
22	CH10_HUMAN	10 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPE1 PE=1 SV=2	1
23	EF1G_HUMAN	Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens GN=EEF1G PE=1 SV=3	1
24	EF2_HUMAN	Elongation factor 2 OS=Homo sapiens GN=EEF2 PE=1 SV=4	1
25	TBB1_HUMAN	Tubulin beta-1 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB1 PE=1 SV=1	1
26	CALM_HUMAN	Calmodulin OS=Homo sapiens GN=CALM1 PE=1 SV=2	1
27	ENPL_HUMAN	Endoplasmin OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1	1

nLC-MALDI-MS/MS-Messungen des Fusionsproteins MLH1-ITGA9 (Crosslinker BS3)

prot_hit_num	prot_acc	prot_desc	peptides
1	HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1	16
2	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	11
3	HSP71_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1 OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5	12
4	K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	8
5	TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1B PE=1 SV=1	7
6	ALBU_HUMAN	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	8
7	HSP76_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 6 OS=Homo sapiens GN=HSPA6 PE=1 SV=2	6
8	K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=5	5
9	MLH1_HUMAN	DNA mismatch repair protein Mlh1 OS=Homo sapiens GN=MLH1 PE=1 SV=1	7
10	TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2	5
11	S10A9_HUMAN	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1	2
12	S10A7_HUMAN	Protein S100-A7 OS=Homo sapiens GN=S100A7 PE=1 SV=4	3
13	TBB2C_HUMAN	Tubulin beta-2C chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2C PE=1 SV=1	3

Anhang

14	S10A8_HUMAN	Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1	3
15	ITGA9_HUMAN	Integrin alpha-9 OS=Homo sapiens GN=ITGA9 PE=1 SV=2	2
16	K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	1
17	TBA4B_HUMAN	Putative tubulin-like protein alpha-4B OS=Homo sapiens GN=TUBA4B PE=5 SV=2	1
18	GRP78_HUMAN	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2	3
19	S1A7B_HUMAN	Protein S100-A7-like 2 OS=Homo sapiens GN=S100A7L2 PE=2 SV=1	1
20	PIMT_HUMAN	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase OS=Homo sapiens GN=PCMT1 PE=1 SV=3	2
21	GRP75_HUMAN	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=1 SV=2	1
22	HORN_HUMAN	Hornerin OS=Homo sapiens GN=HRNR PE=1 SV=2	2
23	MIF_HUMAN	Macrophage migration inhibitory factor OS=Homo sapiens GN=MIF PE=1 SV=4	1
24	CALM_HUMAN	Calmodulin OS=Homo sapiens GN=CALM1 PE=1 SV=2	1
25	K2C6B_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5	2
26	UBIQ_HUMAN	Ubiquitin OS=Homo sapiens GN=RPS27A PE=1 SV=1	2
27	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1	1
28	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1	1
29	K2C6A_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6A OS=Homo sapiens GN=KRT6A PE=1 SV=3	2
30	K2C75_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 75 OS=Homo sapiens GN=KRT75 PE=1 SV=2	1
31	ACTBL_HUMAN	Beta-actin-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=ACTBL2 PE=1 SV=2	1
32	HSP74_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo sapiens GN=HSPA4 PE=1 SV=4	1
33	HPS6_HUMAN	Hermansky-Pudlak syndrome 6 protein OS=Homo sapiens GN=HPS6 PE=2 SV=1	1
34	PYC_HUMAN	Pyruvate carboxylase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PC PE=1 SV=2	1
35	K1C14_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	1
36	CC155_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 155 OS=Homo sapiens GN=CCDC155 PE=2 SV=2	1
37	UBA6_HUMAN	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 6 OS=Homo sapiens GN=UBA6 PE=1 SV=1	1
38	TPIS_HUMAN	Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens GN=TPI1 PE=1 SV=2	1
39	FRMD5_HUMAN	FERM domain-containing protein 5 OS=Homo sapiens GN=FRMD5 PE=2 SV=1	1

nLC-MALDI-MS/MS-Messungen des Fusionsproteins MLH1-ITGA9 (Crosslinker DTBP)

prot_hit_num	prot_acc	prot_desc	peptides
1	HSP71_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1 OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5	13
2	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1	6

Anhang

		PE=1 SV=6	
3	HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1	8
4	TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1B PE=1 SV=1	5
5	HSP76_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 6 OS=Homo sapiens GN=HSPA6 PE=1 SV=2	5
6	K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens GN=KRT9 PE=1 SV=3	5
7	K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10 OS=Homo sapiens GN=KRT10 PE=1 SV=5	4
8	S10A9_HUMAN	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens GN=S100A9 PE=1 SV=1	2
9	K2C6B_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6B OS=Homo sapiens GN=KRT6B PE=1 SV=5	4
10	TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2	4
11	S10A7_HUMAN	Protein S100-A7 OS=Homo sapiens GN=S100A7 PE=1 SV=4	2
12	MLH1_HUMAN	DNA mismatch repair protein Mlh1 OS=Homo sapiens GN=MLH1 PE=1 SV=1	5
13	TBA8_HUMAN	Tubulin alpha-8 chain OS=Homo sapiens GN=TUBA8 PE=1 SV=1	3
14	K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo sapiens GN=KRT2 PE=1 SV=2	1
15	TBA4B_HUMAN	Putative tubulin-like protein alpha-4B OS=Homo sapiens GN=TUBA4B PE=5 SV=2	1
16	CALR_HUMAN	Calreticulin OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1	2
17	S1A7B_HUMAN	Protein S100-A7-like 2 OS=Homo sapiens GN=S100A7L2 PE=2 SV=1	1
18	CALM_HUMAN	Calmodulin OS=Homo sapiens GN=CALM1 PE=1 SV=2	1
19	S10A8_HUMAN	Protein S100-A8 OS=Homo sapiens GN=S100A8 PE=1 SV=1	2
20	GRP75_HUMAN	Stress-70 protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPA9 PE=1 SV=2	2
21	UBIQ_HUMAN	Ubiquitin OS=Homo sapiens GN=RPS27A PE=1 SV=1	1
22	K2C5_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens GN=KRT5 PE=1 SV=3	1
23	TBB2C_HUMAN	Tubulin beta-2C chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2C PE=1 SV=1	2
24	K1C14_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens GN=KRT14 PE=1 SV=4	1
25	ROA1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA1 PE=1 SV=4	1
26	GRP78_HUMAN	78 kDa glucose-regulated protein OS=Homo sapiens GN=HSPA5 PE=1 SV=2	2
27	HORN_HUMAN	Hornerin OS=Homo sapiens GN=HRNR PE=1 SV=2	1
28	MIF_HUMAN	Macrophage migration inhibitory factor OS=Homo sapiens GN=MIF PE=1 SV=4	1
29	CC64B_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 64B OS=Homo sapiens GN=CCDC64B PE=2 SV=2	1
30	VP13C_HUMAN	Vacuolar protein sorting-associated protein 13C OS=Homo sapiens GN=VPS13C PE=1 SV=1	1
31	ITA9_HUMAN	Integrin alpha-9 OS=Homo sapiens GN=ITGA9 PE=1 SV=2	2
32	PYC_HUMAN	Pyruvate carboxylase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PC PE=1 SV=2	1
33	FRMD5_HUMAN	FERM domain-containing protein 5 OS=Homo sapiens	1

Anhang

			GN=FRMD5 PE=2 SV=1
34	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1	1
35	RNF31_HUMAN	RING finger protein 31 OS=Homo sapiens GN=RNF31 PE=1 SV=1	1
36	ACTBL_HUMAN	Beta-actin-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=ACTBL2 PE=1 SV=2	1
37	ACHD_HUMAN	Acetylcholine receptor subunit delta OS=Homo sapiens GN=CHRND PE=1 SV=1	1

9.2 Lebenslauf

Name	Jenny Hsieh
Anschrift	Kornhausgässle 5 88239 Wangen im Allgäu
Telefon	0177-7154543 oder 0179-4501016
Geburtsdatum	11.06.82
Geburtsort	Schwetzingen (Baden-Württemberg)
Eltern	Dr. Wei-Chung Hsieh, Apotheker Eng-Tau Hsieh geb. Wu, OP-Krankenschwester
Geschwister	1 Bruder, Jensen, geb. 04.04.78
Schulbildung	1988-1992 Grund- und Hauptschule Achern 1992-2001 Gymnasium Achern
Schulabschluss	Allgemeine Hochschulreife 2001
Studium	Pharmazie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Studienbeginn WS 01/02; zum SS 03 Wechsel an die Johannes-Gutenberg-Universität Mainz; WS 04/05: 1. Staatsexamen SS 07: 2. Staatsexamen WS 08/09: 3. Staatsexamen Seit 01.01.09 Promotion im Fachbereich Biochemie, Chemie und

Praktika

Pharmazie der Goethe-Universität am Institut für Pharmazeutische Biologie unter Leitung von Prof. Dr. Rolf Marschalek

Thema der Promotion: Funktionelle Analyse des MLH1-ITGA9 Fusionsproteins einer Lynch Syndrom-Familie

Famulatur in der Alten Hof-Apotheke in Baden-Baden

Famulatur in der St. Vincentius-Krankenhaus-Apotheke Karlsruhe

01.11.07-30.04.08:

1. Hälfte des Praktischen Jahres in der Augustus-Apotheke in Mainz

01.05.08-31.10.08

2. Hälfte des Praktischen Jahres an der JWG-Universität Frankfurt a.M. am Institut für Pharmazeutische Biologie

9.3 Publikationen, Vorträge und Präsentationen

Publikation:

A novel mechanism in Lynch syndrom patients: truncated MLH1 or the MLH1•ITGA9 fusion gene cause a cytosolic retention of BRCA1

(Manuskript noch in Bearbeitung)

Vorträge:

Verifying the Oncogenic Mechanism of the *MLH1-ITGA9* Fusionogene

Vortrag im Rahmen des Doktorandenseminars der pharmazeutisch-chemischen Institute und des pharmazeutisch-biologischen Instituts der Goethe-Universität Frankfurt; SS 2009

Functional analysis of the novel MLH1-ITGA9 fusion protein of a Lynch syndrome family

Vortrag auf der Jahrestagung der Kind-Phillip-Stiftung für Leukämieforschung in Wilsede; SS 2010

9.4 Danksagung

Prof. Dr. Rolf Marschalek danke ich für die Überlassung dieses arbeitskreisunüblichen Themas (weswegen ich glücklicherweise um die Hämatopoiese drumherum gekommen bin), sowie die sehr rasche Durchsicht der Arbeit und sein Vertrauen, das er bei der Bewältigung dieses Themas in mich gesetzt hat.

Prof. Dr. Theo Dingermann für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung, Einblicke in ein frisches, unkonventionelles Pharmaziestudium sowie zahlreiche interessante und lehrreiche zweite Staatsexamina.

Marion Rohmer vom Arbeitskreis Prof. Dr. Karas für die Durchführung der nLC-MALDI-Messungen und die Möglichkeit, außerhalb von Süddeutschland zu „badeln“ und zu „schwäbeln“.

Laura Pufahl für die Durchführung des (leider erfolglosen) Reporterassays sowie die Unterstützung beim PathScan-Assay und die Bereitstellung diverser Geräte.

Nicole Weber danke ich für die Motivation und ihr persönliches Engagement sowie die zahlreichen Ideen und Vorschläge.

Den technischen Assistentinnen Silvia Bracharz, Jenny Merkens und Freia Pfeil danke ich unendlich dafür, dass sie mir immer bereitwillig Arbeit abgenommen haben, vor allem in der Endphase der Doktorarbeit.

Dr. Adelheid Bursen danke ich für die Hilfe bei zahlreichen FACS-Messungen sowie die Erkenntnis, dass viel Rauchen und Colatrinken nicht unbedingt einen Ulkus erzeugen, Dr. Eric Kowarz für zahlreiche Kloniertipps und Dr. Claus Meyer für die Betreuung vor allem in der Anfangsphase.

Dr. Ilse Zündorf für die gute Organisation, ohne die ein reibungsloses Bioll-Praktikum nicht möglich gewesen wäre.

Besonderer Dank gilt meinen damaligen und jetzigen Kollegen, die einen großen Anteil daran hatten, dass die letzten Jahre trotz einiger Rückschläge immer mit viel Spaß und Freude verbunden waren: Dr. Nadine Spilger danke ich für pharmazeutische Unterstützung, viele anregende Gespräche im und außerhalb des Labors und die Überwindung des inneren Schweinehundes, Dr. Birgit Pleß für lustige Stunden im Labor, wenn alle anderen schon zuhause waren und Dr. Karen Schwabe für viel Rookie-Hilfe. Carola Prella danke ich neben vielen lustigen Gesprächen vor allem für's Händchenhalten bei der Auswertung diverser enzymatischer Nachweisverfahren und Bastian Scholz für seinen guten Musikgeschmack, viel lautes Ha-Ha und MeckMeckMeck. Außerdem danke ich für viele unterhaltsame Kaffeeraum-, Wilsede- und Hamburgstunden: Katharina Karl, Tanja Rößler, Fabian Mück, Alexander Gnos und Christian Engelbrecht.

Für die Bewältigung von viel bürokratischem Aufwand danke ich den Sekretärinnen Erika Lemmer, Bärbel Abbeg-Köhler, Brigitte Hahling und Sigrid Schickling-Herzog.

Dr. Mariana Emerenciano Cavalcanti de Sa, thank you for getting to know you and your family; I hope you enjoyed your stay in Germany!

Und last but not least danke ich meiner Familie, die immer hinter mir stand und meinem Freund Veit dafür, dass es ihn gibt und dass er mich liebt!

DANKE!

ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den.....
(Unterschrift)

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über

„Funktionelle Analyse des MLH1-ITGA9 Fusionsprotein einer Lynch-Syndrom Familie“

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den..... (Unterschrift)