

Identifizierung von TNF α -induzierten Überlebensgenen mit der Cre-Genfalle

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Karsten Sturm
aus Lüdinghausen

Frankfurt am Main 2006

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Theodor Dingermann

Prof. Dr. Harald von Melchner

Datum der Disputation:

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	
2.1 Resistenz gegenüber Apoptose als essentieller Mechanismus zur Krebsentstehung	3
2.2 Apoptose als lebenswichtiges Suizidprogramm	4
2.3 Signalwege und Mechanismen der Apoptose	6
2.4 Die Regulation der Apoptose	8
2.5 Zelluläre Überlebensfaktoren	9
2.6 Modellsystem zur Identifizierung von Überlebensgenen	9
2.7 Identifizierung transient exprimierter Gene mittels einer Genfallenstrategie	11
3. Ergebnisse	
3.1 Genfallenstrategie zur Identifizierung TNF α -induzierter Gene in HeLa-Zellen	13
3.2 Herstellung und Charakterisierung einer PGKloxPurolox β geo exprimierenden HeLa-Reporterzelllinie	16
3.2.1 Phänotypische Charakterisierung der puro β geo-Reporterklone	17
3.2.2 Genotypische Verifizierung der puro β geo-Reporterklone	20
3.2.3 Nachweis der TNF α -Sensitivität von Klon 260	21
3.3 Herstellung der Integrationsbank und Selektion für TNF α -induzierte Gene	23
3.4 Charakterisierung der Genfallen-Integrationsorte mittels inverser (i)PCR	24
3.5 Datenbankanalyse der flankierenden Sequenzen	27
3.5.1 Lokalisation der U3Cre-Genfallenintegrationen	28
3.5.2 Orientierung der U3Cre-Genfallenintegration	29
3.5.3 Funktionelles Spektrum der getrappten Gene	32
3.5.4 Validierung von Kandidatengenen	33
3.6 Nachweis der TNF α -Regulation von Kandidatengenen	35
4. Diskussion	
4.1 Evaluation des Cre/loxP-Rekombinationssystems	38
4.2 Integration der Genfalle in antisense-Orientierung	40
4.3 Identifizierung von Überlebensgenen durch Aktivierung des TNF α -Signalweges	45

5. Material/Methoden

5.1 Material

5.1.1 Vektoren und Konstrukte	49
5.1.2 Synthetische Oligonukleotide	49
5.1.3 Bakterienstämme	50
5.1.4 Biochemikalien und Kits	50
5.1.5 Chemikalien	51
5.1.6 Verbrauchsmaterial	51
5.1.7 Enzyme und enzymatische Reaktionssysteme	51
5.1.8 Geräte	51

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Arbeitsvorbereitungen	52
5.2.2 Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung	52
5.2.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen	53
5.2.4 Zellzahlbestimmung	54
5.2.5 Bestimmen der metabolischen Aktivität	54
5.2.6 Colorimetrischer Nachweis von intrazellulärer, bakterieller β-Galaktosidase in Säugerzellen	55

5.3 Retroviraler Gentransfer

5.3.1 Arbeiten mit rekombinanten Retroviren	55
5.3.2 Herstellung von VSV-G pseudotypisierten <i>MLV</i> -Retroviren	56
5.3.3 Konzentrierung von VSV-G pseudotypisierten Retroviren	57
5.3.4 Infektion von Wirtszellen mit retroviralen Partikeln	57
5.3.5 Herstellung von HeLa-Reporterklonen	57
5.3.6. Infektion von HeLa mit Cre-Expressionsvirus	58
5.3.7 Titration der Genfalle auf HeLa260 und Herstellung der Integrationsbank	58

5.4 Herstellung und Analyse rekombinanter DNA

5.4.1 Isolierung chromosomaler DNA aus Säugerzelllinien	60
5.4.2 Präparation von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	60
5.4.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	60
5.4.4 Restriktionsspaltungen von DNA	61
5.4.5 Agarose-Gelelektrophoresen	61
5.4.6 Reinigung und Konzentrierung von DNA (Ethanol-Fällung)	61
5.4.7 Präparation von DNA-Fragmenten durch Elution aus Agarose-Gelen	61

5.4.8 Reinigung von DNA nach enzymatischen Manipulationen	62
5.4.9 Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i>	62
5.4.10 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA	63
5.4.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	63
5.4.12 Inverse PCR	64
5.4.13 Klonierung von PCR-Produkten in einen T-Vektor	65
5.4.14 Kolonie-PCR	65
5.4.15 DNA-Sequenzanalyse	65
5.5 RNA-Methoden	
5.5.1 Extraktion von Gesamt-RNA und polyA ⁺ -RNA aus eukaryontischen Zelllinien	66
5.5.2 Konzentrationsbestimmung der präparierten RNA	67
5.5.3 Synthese von cDNA durch reverse Transkription	67
5.5.4 Northern-Blot Analyse	67
5.5.4.1 Elektrophoretische Auftrennung von RNA	67
5.5.4.2 Kapillartransfer der RNA auf eine Nylon-Membran	68
5.5.4.3 Radioaktive DNA-Markierung mittels asymmetrischer PCR	69
5.5.4.4 Radioaktive DNA-Markierung mittels „random primed“ – Sonden	69
5.5.4.5 Hybridisierung der geblotteten RNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	69
6. Literatur	71
7. Anhang	81

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
cDNA	complementary DNA
Cre	causes recombination (of the bacteriophage P1 genome)
cm	Zentimeter
CREB	cyclic AMP response element binding protein
CTP	Cytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetra-Acetat
FADD	Fas associating protein with a death domain
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	hour
Il-1	Interleukin-1
IPTG	Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranoside
Kb	Kilobasen
kbp	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani
LTR	long terminal repeat
loxP	locus over x-ing over P1
min	Minuten
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MOPS	3-(N-morpholino) propanesulfonic acid
mRNA	messenger RNA

nm	Nanometer
NF-κB	Nuclear factor κB
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PBS	phosphate buffered saline
pmol	Pikomol
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
sec	second
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminoethan
U	Unit (Enzymeinheit)
UTR	untranslated region
VSV-G	vesicular stomatitis virus G glycoprotein
WT	Wildtyp

1 Zusammenfassung

Das pro-inflammatorische Zytokin Tumornekrose-Faktor alpha (TNF α) kann, abhängig vom zellulären Kontext, sowohl Wachstum als auch Apoptose in Säugerzellen induzieren. Diese gegensätzlichen Effekte sind zurückzuführen auf die Fähigkeit von TNF α verschiedene Signalwege in der Zelle zu aktivieren. Nach einer vorübergehenden Aktivierung eines anti-apoptotischen Genexpressionsprogrammes über einen membranständigen TNF-Rezeptor-Multiproteinkomplex und den Transkriptionsfaktor NF- κ B, kommt es zur Modifikation des Signaltransduktionskomplexes. Dieser ist nun in der Lage andere Adapterproteine und Caspasen zu rekrutieren, was letztendlich zur Einleitung der Apoptose führt.

Ziel dieser Arbeit war es neue Überlebensgene zu identifizieren, die nach TNF α -Behandlung transient aktiviert werden, da diese Gene in Tumorzellen möglicherweise dazu beitragen, apoptotischen Prozessen entgegenzuwirken. Langfristig könnten ihre Genprodukte als diagnostische Marker oder als Angriffspunkte für neue Therapieansätze dienen.

Um TNF α -induzierte Überlebensgene zu identifizieren wurde als Modellsystem die menschliche Cervixkarzinomzelllinie HeLa eingesetzt, welche resistent gegenüber TNF α ist. Allerdings wird bei Blockade der Translation, zusätzlich zu der Zytokinbehandlung, Apoptose ausgelöst. Dies zeigt, dass bei der alleinigen Zugabe von TNF α die Transkription von Überlebensgenen induziert wird, deren Aktivität apoptotische Signalwege blockiert. Zur Identifizierung dieser transient aktivierten Gene wurde eine Strategie benutzt, welche auf einer Kombination von Genfallen-Mutagenese und Cre/loxP-spezifischer Rekombination beruht. Zunächst wurde eine HeLa-Reporterzelllinie mit einem stabil integrierten, Cre-abhängigen, molekularen Schalter generiert. Dieser besteht aus einer Kassette mit einem konstitutiv aktiven Promotor, der die Expression eines "gefloxten", selektionierbaren Markergens antreibt. 3' hierzu befindet sich ein zweites Markergen, das in dieser Konfiguration transkriptionell inaktiv ist. Die Reporterzelllinie wurde mit einer retroviralen Genfalle transduziert, die ein Cre-Rekombinasegen trägt, aber keine *cis*-regulatorischen DNA-Elemente besitzt, so dass die Cre-Expression vollständig von den zellulären Sequenzen in der Nachbarschaft der Integrationsstelle des Genfallen-Provirus abhängig wird. Eine transkriptionelle Aktivierung der Cre-Genfalle, auch wenn diese nur transient ist, führt zu einer Deletion des 5'-gelegenen Markergens in dem Selektionssystem und damit zur Expression des 3'-Markers. Diese irreversible Rekombination, die ein Indikator für eine

transkriptionelle Aktivierung der Genfalle ist, wurde zur Selektion einer Zellpopulation mit Genfallen-Integrationen in TNF α -induzierten Genen genutzt.

Aus einer aus 2×10^6 unabhängigen Insertionen bestehenden Genfallen-Integrationsbank wurde in einem zweistufigen Selektionsverfahren 50 HeLa-Zelllinien mit Genfalleninsertionen in TNF α induzierbaren Genen isoliert. Die Sequenzierung Genfallen-flankierender genomischer Sequenzen und anschließender Datenbankanalyse ergab folgende Verteilung der Genfallen-Integrationen: 45 % lagen in annotierten Genen, 19 % in Genen mit unbekannter Funktion, 19 % in hypothetischen Genen, 5 % in ESTs (expressed sequence tags), 6 % in repetitiven Elementen und 6 % in nicht-annotierten Regionen. Neben bekannten TNF α -regulierten Genen wurde eine Reihe von neuen Genen identifiziert, welche bisher noch nicht mit der TNF α -Signaltransduktionskaskade assoziiert worden waren. Die Validierung der so gefundenen Gene in Northern-Blots machte deutlich, dass der Expressionsanstieg nach TNF α -Stimulation insgesamt nicht sehr stark ausgeprägt war, zeigte aber eine klare Induktion zweier Gene (*rhobtb3*, *atf-1*) nach Zytokin-Stimulation.

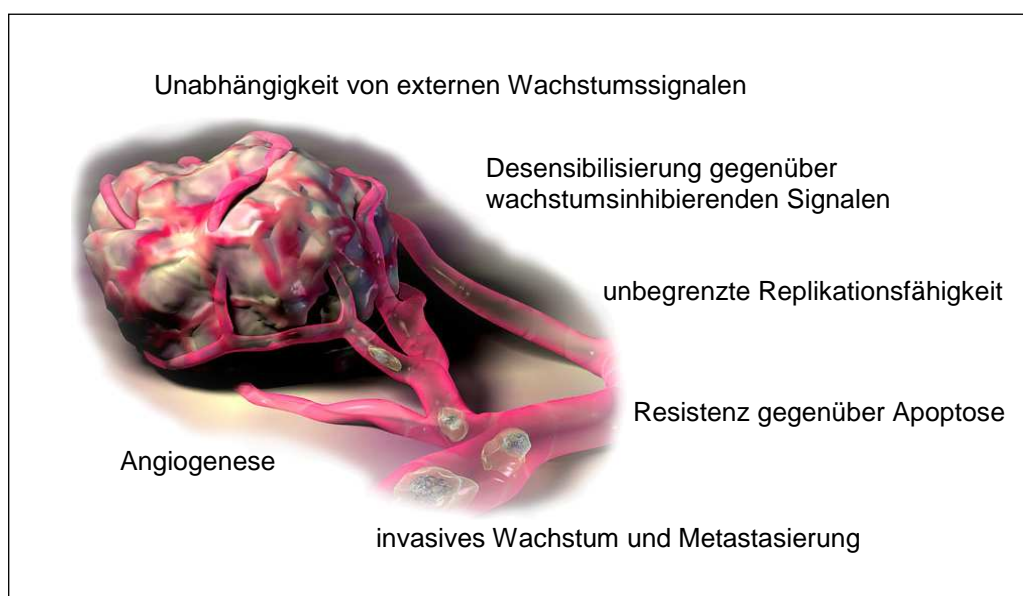
Interessanterweise erfolgten die Genfalleninsertionen in 50 % aller Fälle in umgekehrter Orientierung zum annotierten Gen, was darauf hindeutet, dass mit Hilfe der gewählten Strategie nicht-kodierende RNAs identifiziert werden können. Obwohl der Nachweis dieser Transkripte und ihre biologische Relevanz noch aussteht, können sie in zwei Kategorien eingeteilt werden. Integrationen oberhalb von Genen oder in 5'-UTRs, repräsentieren entweder regulatorische RNAs, die mit Promotorelementen interagieren oder Transkripte, welche unter der Kontrolle von bidirektionalen Promotoren stehen. Die zweite Kategorie, Insertionen auf dem nicht-kodierenden Strang, innerhalb von Introns, legen das Vorkommen natürlicher antisense-Transkripte nahe. Interessanterweise liegen 50 % aller antisense-Integrationen 3' zu potentiellen Transkriptionsstartstellen, die mit verschiedenen Algorithmen vorhergesagt wurden. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass entsprechende genomische Regionen tatsächlich transkribiert werden. Aufgrund neuer Erkenntnisse über die Funktionen von nicht-kodierenden RNA-Molekülen, gerade auch in Zusammenhang zur Tumorprogression, könnte deren mögliche regulatorische Rolle innerhalb der TNF α -Signaltransduktionskaskade von großem Interesse sein.

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente führten nicht nur zur Identifizierung neuer, potentieller TNF α -Zielgene, sondern zeigten auch, dass Genfallen ein nützliches Werkzeug bei der Suche nach nicht-kodierenden RNAs in lebenden Zellen sein können und ihr Einsatz möglicherweise die Methode der Wahl für die Identifizierung derartiger Transkripte darstellt.

2 Einleitung

2.1 Resistenz gegenüber Apoptose als essentieller Mechanismus zur Krebsentstehung

In einem gesunden Organismus ist Zellteilung und Proliferation streng kontrolliert. Krebszellen entziehen sich dieser Kontrolle als Folge von genetischen Schäden (Mutationen) und proliferieren deswegen ungehemmt. Die Erkenntnisse aus vielen Jahren Krebsforschung am Menschen und im Tiermodell haben verdeutlicht, dass eine Reihe von konsekutiven Mutationen zunächst einen Wachstumsvorteil der betroffenen Zellen mit sich bringt, der letztendlich in Transformation ausartet und zur Krebszelle führt [1]. Dabei zeigt sich, dass derartige Transformationsprozesse charakteristischen, biochemischen und zellulären Prinzipien folgen, die allen Krebsarten gemeinsam sind [2]. Die wesentlichen Veränderungen in der Zellphysiologie, die zur Transformation führen sind in Abbildung 1 schematisch zusammengefasst [3]. Dazu gehört die Fähigkeit sich unabhängig von externen Wachstumssignalen zu vermehren, eine Desensibilisierung gegenüber wachstumshemmenden Signalen, eine unbegrenzte Replikationsfähigkeit, bei soliden Tumoren die Fähigkeit zur Angiogenese-Induktion und invasivem Wachstum bzw. Bildung von Metastasen. Eine der wichtigsten Veränderungen überhaupt ist die Fähigkeit der Tumorzelle den programmierten Zelltod zu umgehen. Dies geschieht vorwiegend über die Hochregulation von Überlebensgenen deren Identifizierung mit Hilfe einer Genfallenstrategie in einem *in vitro* Tumormodell im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen.



nach www.gcarlson.com

Abb. 1: Kennzeichen der Krebsentwicklung.

2.2 Apoptose als lebenswichtiges Suizidprogramm

Apoptose ist ein streng kontrolliertes, zelluläres Suizidprogramm, das zu einem geordneten Zellverlust führt und anders als die Nekrose keine entzündlichen Umgebungsreaktionen hervorruft [4]. Die Fähigkeit zur Apoptose oder zum programmierten Zelltod besitzen sämtliche Zellen bei Menschen, Säugern und Vertebraten. Die ersten Hinweise auf ein evolutionär stark konserviertes Apoptoseprogramm fanden sich in Untersuchungen am Nematoden *Caenorhabditis elegans*. So wurden in Apoptose-defizienten Wurm-Mutanten Gene identifiziert, die für Zelltod und anschließende Phagozytose der apoptotisch veränderten Zellen verantwortlich sind [5]. Später wurden Homologe dieser Gene auch bei Mensch und Maus gefunden.

Apoptose kann durch eine Reihe von extra- und intrazellulären Signalen induziert werden. Zu den extrazellulären gehören u.a. Hormone, Zytokine oder der Entzug von Wachstumsfaktoren. Ein wichtiges intrazelluläres Signal ist z.B. eine irreparable Schädigung der DNA. Unabhängig von der Signalherkunft entfaltet sich Apoptose immer gleich. Dabei kommt es zunächst zur Membraninversion und zur Chromatinkondensation entlang der Kernmembran. Während der Schrumpfung der Zelle entstehen Protuberanzen an der Plasmamembran („membrane blebbing“). Des Weiteren kommt es zu einer spezifischen, internukleosomalen Fragmentierung der DNA und zur Auflösung der Zelle in einzelne membranumhüllte Fragmente (apoptotic bodies). Diese werden durch Zellen, die mit Hilfe von chemoattraktiven Substanzen („eat me Signalen“) rekrutiert werden, phagozytiert [6]. Der gesamte Vorgang dauert etwa 30 - 120 min.

Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose ein physiologischer Prozess mit dem Ziel, solche Zellen die vom Gesamtorganismus nicht mehr benötigt werden oder diesem schaden könnten zu eliminieren. Im Gegensatz dazu ist die Nekrose ein pathologischer Prozess bei dem es zu keinem regelmäßigen Abbau von DNA oder Proteinen kommt. Infolge einer erhöhten Permeabilität der Plasmamembran kommt es stattdessen zu einer Schwellung des Zytoplasmas (Onkosis) und der mitochondrialen Matrix. Dies führt schließlich zum Platzen der Zelle [7]. Zu den klassischen Auslösern von Nekrose gehören u.a. Hyperthermie, Hypoxie und verschiedene Toxine [8]. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Merkmale der beiden Zelltodarten zusammengefasst.

Im erwachsenen Organismus ist die Apoptose für die Erhaltung der zellulären Homeostase unentbehrlich. So ist sie z.B. in sich regenerierenden Geweben wie Darm, Haut und Blut für die Eliminierung ausgedienter Zellen verantwortlich. Darüber hinaus eliminiert Apoptose irreversibel geschädigte Zellen und verhindert dadurch die Vermehrung potentiell

tumorigener Zellen. Deswegen ist für Krebsentwicklung eine pathologische Unterbindung von Apoptose eine Voraussetzung [9, 10].

Apoptose	Nekrose
Zellbiologische Merkmale	
<ul style="list-style-type: none"> • gezielte Eliminierung von einzelnen Zellen • induziert durch physiologische Stimuli • Verlust des Kontaktes zu Nachbarzellen/Basalmembran • intakte Membran • Erhalt der Organellen • Zellschrumpfung (Onkosis) • Chromatinkondensation (Pyknose) • apoptotische Körperchen 	<ul style="list-style-type: none"> • Tod von Zellgruppen • induziert durch nicht physiologische Einflüsse • Adhäsion zwischen den Zellen und zur Basalmembran bleibt bestehen • Verlust der Membranintegrität • Zerstörung der Zellstruktur (Organellen schwellen und lysieren) • Schwellung des Zytoplasmas der Mitochondrien • Auflockerung des Chromatins • keine Vesikelformation, komplette Lyse
Biochemische Merkmale	
<ul style="list-style-type: none"> • ATP-abhängig • prälytische DNA-Fragmentierung (frühes Ereignis des Zelltodes) • Spaltung von Caspase-Substraten 	<ul style="list-style-type: none"> • keine Energie erforderlich • postlytische DNA-Fragmentierung (spätes Ereignis des Zelltodes) • keine Aktivierung von Caspasen

Tab. 1: Merkmale von Apoptose und Nekrose im Vergleich

2.3 Signalwege und Mechanismen der Apoptose

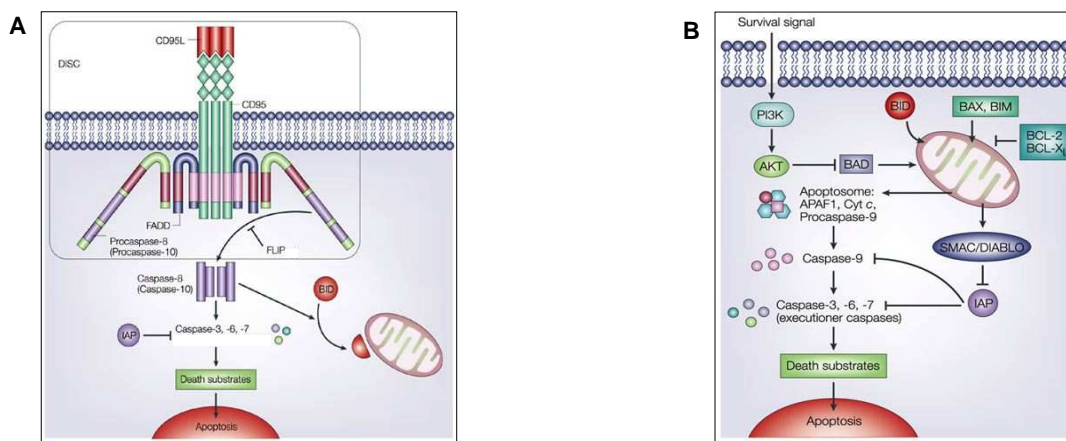
Wie in Abbildung 2 dargestellt, kann Apoptose auf zwei unterschiedlichen Wegen initiiert werden. Der eine Weg, bekannt als „extrinsischer Weg“ involviert die so genannten Todesrezeptoren (TNFR1 (tumour necrosis factor receptor 1)), Fas (CD95)- und TRAIL-R1/-R2 (TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor 1/2). Der andere Weg, bekannt als „intrinsischer Weg“, involviert die Mitochondrien. Letzterer wird vorwiegend von zellreduktiven Zytostatika und ionisierenden Strahlen aktiviert.

Todesrezeptoren gehören zur Familie der Tumor-Nekrose Faktor (TNF)-Rezeptoren und besitzen eine strukturell konservierte so genannte Todesdomäne [11]. An diese Domäne binden spezifische, intrazelluläre Adapterproteine. Neuere Untersuchungen am TNF-Rezeptor zeigen, dass es zumindest in diesem Fall zur Bildung von zwei Signalkomplexen kommt, die verschiedene weitere intrazelluläre Signalproteine enthalten. Der membranständige Komplex I führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Durch Modifikationen und Endozytose kann ein zytosolischer Komplex II entstehen, der vom Todesrezeptor abdissoziiert und das Protein FADD (Fas-associated death domain protein) rekrutiert. Als Folge werden die Initiatorcaspasen-8 und -10 an diesen DISC- (death inducing signalling complex) genannten Signalkomplex gebunden und dadurch aktiviert (siehe Abb. 2A).

Die zweite Möglichkeit Apoptose zu initiieren funktioniert über die Freisetzung von Cytochrom c, einem Protein der Atmungskette, aus den Zwischenräumen der mitochondrialen Membran, ins Zytoplasma [12, 13]. Im Zytosol assoziiert es mit Apaf1 (apoptotic protease activating factor-1), ATP und Procaspase-9. Innerhalb dieses Komplexes, der als Apoptosom bezeichnet wird, kommt es zur Aktivierung von Caspase-9 (siehe Abb. 2B).

Beide Signalwege sind nicht komplett voneinander unabhängig. Die Induktion des Todesrezeptors führt zum enzymatischen Abbau des Proteins BID durch Caspase-8 und aktiviert dadurch den mitochondrialen Signalweg. Beiden Signalwegen gemeinsam ist die Aktivierung von Caspasen (cysteine aspartyl-specific proteases), die Mitglieder einer hochkonservierten Familie von Cystein-Proteasen sind [14]. Die apoptotischen Caspasen werden den Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9, -10) oder den Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) zugeordnet. Sie werden als Zymogene synthetisiert und sind in den meisten Zellen als Proenzyme konstitutiv vorhanden. Die proteolytische Prozessierung zur Aktivierung der Caspasen bedarf mindestens zwei aufeinander folgender Spaltungen an Aspartatresten, um die große und kleine Untereinheit voneinander und von der Prodomäne zu trennen. Caspasen sind in ihrer aktiven Konformation heterotetramere Proteine. Dieser Komplex setzt sich aus zwei identisch großen und zwei identisch kleinen Untereinheiten zusammen. Sie werden durch eine

erste proteolytische Prozessierung in eine kurze und lange Untereinheit getrennt, gefolgt von einem zweiten Prozessierungsschritt, bei dem die N-terminale Prodomäne entfernt wird. Dadurch entstehen funktionell aktive („reife“) Caspasen, welche wiederum durch andere Proteasen oder Caspasen aktiviert werden können. Die Prodomänen der Effektorcaspasen sind verkürzt und werden überwiegend durch andere Caspasen aktiviert [15]. Neben der autokatalytischen Aktivierung können sich die Caspasen auch gegenseitig aktivieren. Die Aktivierung von Initiatorcaspasen führt zur Aktivierung der Effektorcaspasen (siehe oben) und damit zum Aufbau einer proteolytischen Kaskade. Der damit erreichte Verstärkereffekt erinnert an die Blutgerinnungskaskade. In der Folge kommt es zum enzymatischen Abbau verschiedener zellulärer Substrate, was zu den charakteristischen, apoptotischen Phänotypen und letztlich zum Untergang der Zelle führt [16]. Der Abbau von Laminen im Nukleus führt zur Chromatinkondensation und zur Schrumpfung des Zellkerns. Die Zerstörung von ICAD (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease), einem Inhibitor der DNase CAD, erlaubt die typische DNA-Fragmentierung. Der Abbau von Proteinen des Zytoskeletts, wie z.B. Aktin, Plektin, Rho Kinase 1 und Gelsolin führt zur Fragmentierung der Zelle und zur Bildung von „apoptotic bodies“.



aus Igney/Krammer, Nature Reviews Cancer, 2002

Abb. 2: Induktion von Apoptose durch Todesrezeptoren/Mitochondrien. Nähere Erläuterungen dazu siehe Text. A. Todesrezeptor-induzierte Apoptose ("extrinsischer Signalweg") am Beispiel von CD95. B. Mitochondrial-induzierte Apoptose ("intrinsischer Signalweg"). Beide Signalwege sind über das Protein BID miteinander verknüpft.

2.4 Die Regulation der Apoptose

Das zelluläre Apoptoseprogramm umfasst viele Schritte, die durch ein fein abgestimmtes Gleichgewicht verschiedener Komponenten gesteuert werden. Einige bekannte Proteine regulieren dabei, auf unterschiedlichen Ebenen, den apoptotischen Prozess (Abb. 3). Eine wichtige regulatorische Funktion bei der Apoptose erfüllen die konstitutiv exprimierten Proteine der Bcl-2 Familie (B-cell lymphoma 2) deren pro- (Bax, Bak, Bid, Bim), und anti-apoptotische (Bcl-2, Bcl-xL; Bcl-W) Mitglieder sich gegenseitig in Schach halten [17]. Zusammen mit Bcl-xL verhindert Bcl-2 die Aktivierung regulatorischer Caspasen, indem es einen inaktiven Caspasenkomplex an der Oberfläche der Mitochondrien bildet. Erst die Freisetzung der Caspasen aus diesem Komplex hat ihre Aktivierung zur Folge und die Apoptose wird ausgelöst.

Eine weitere Klasse von regulatorischen Proteinen bilden die IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) [18]. Beim Menschen konnten bislang neun Mitglieder identifiziert werden: XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, ML-IAP, ILP2, Livin (KIAP), Apollon und Survivin. Sie zeichnen sich durch 1-3 Cystein-reiche BIR-Domänen (baculoviral inhibitory repeats) aus, die sich als essentiell für die anti-apoptotische Funktion erwiesen haben. Die Bezeichnung entstammt der ursprünglichen Entdeckung gleichartiger Apoptose-Inhibitor-domänen bei Baculoviren [19]. IAPs hemmen die Prozessierung und damit die Aktivierung der Caspasen-3, -7 und -9. Darüber hinaus fungieren einige als Ubiquitin-Ligasen, die auch beim Abbau von gebundenen Caspasen aktiv sind. Interessanterweise haben auch IAPs Gegenspieler. Der bekannteste ist SMAC/DIABLO [20] (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with low pI) der mit der Aktivität von XIAP, cIAP1, cIAP2 und Survivin interferiert.

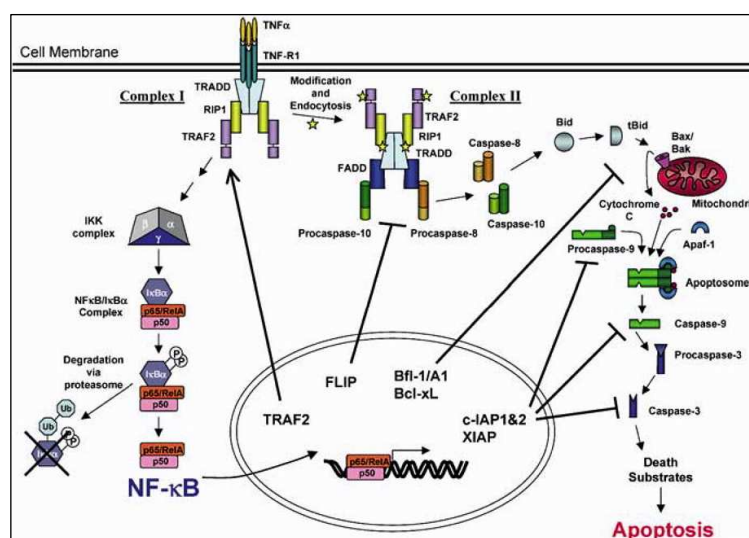


Abb. 3: TNF α -induzierte Signaltransduktionswege. Erläuterungen siehe Text.

2.5 Zelluläre Überlebensfaktoren

Zusätzlich zu den konstitutiv exprimierten pro- und anti-apoptotischen Proteinen verfügen Zellen über transkriptionell regulierte Überlebensmechanismen, die in Gegenwart eines apoptotischen Stimulus zunächst hochreguliert werden. Möglicherweise verhindert dies ein schnelles Absterben von Zellen, die nur transient einem Apoptosesignal ausgesetzt werden. Auf das Vorliegen derartiger Mechanismen wurde ursprünglich aus einer Reihe von Tiermodellen geschlossen. Zum Beispiel wurde beobachtet, dass eine kurzfristige Ischämie die Ausdehnung eines nachträglich induzierten Herz- oder Hirninfarktes signifikant reduziert [21]. Des Weiteren konnte in hämatopoietischen Zellen nach einem Apoptose-Stimulus durch IL-3 Entzug eine transkriptionelle Aktivierung von Überlebensgenen festgestellt werden, welche Zelltod verhinderten [22]. Im Einklang damit sind Beobachtungen, die gezeigt haben, dass unter bestimmten Bedingungen Transkriptionen Inhibitoren Apoptose induzieren [23]. Dies deutet darauf hin, dass übergeordnete Mechanismen das fein regulierte Gleichgewicht zwischen den konstitutiv exprimierten pro- und anti-apoptotischen Faktoren beeinflussen können. Solche Überlebensgene, die in physiologischen Situationen wahrscheinlich nur transient aktiviert werden, könnten zur Apoptose-Resistenz in Tumoren beitragen.

2.6 Modellsystem zur Identifizierung von Überlebensgenen

Zur Identifizierung transient exprimierter Überlebensgene wurde ein Modellsystem gewählt, das sich die Reaktion von HeLa-Zellen auf die Behandlung mit TNF α zunutze macht. Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) ist ein Cytokin, das primär von Zellen des Immunsystems produziert wird, insbesondere von Makrophagen. Nach Bindung an seinen Rezeptor (TNF-R1), löst TNF α ein sehr breites Spektrum an biologischen Effekten aus. Dazu gehören so gegensätzliche Prozesse wie Zellproliferation und apoptotischer Zelltod. Die Ursache dafür ist die fast gleichzeitige Aktivierung von zwei unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden [24]. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung dieser Kaskaden. Entsprechend kommt es nach Bindung von TNF α an den TNFR1-Rezeptor zur Bildung von zwei Signalprotein-Komplexen, die neben dem Rezeptor, weitere Proteine enthalten. An den ersten Komplex I bindet der TNF-Rezeptor assoziierte Faktor 2 (TRAF2), der zur Aktivierung des multifunktionalen Transkriptionsfaktors NF- κ B führt [25]. NF- κ B (nuclear factor kappaB)-Proteine sind an der transkriptionellen Aktivierung von inflammatorischen Genen, als Reaktion auf die Stimulation durch Zytokine wie TNF und Il-1 beteiligt. Darüber hinaus induziert NF- κ B eine Reihe von anti-apoptotischen Genen (IAPs, Bcl-2, TRAF1, -2, cFLIP).

NF- κ B gehört zur Familie der Rel-Proteine und ist als Dimer aktiv. Diese Familie umfasst bei Vertebraten fünf Mitglieder, RelA, RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- κ B1) und p100/p52 (NF- κ B2), denen die für DNA-Bindung, Dimerisierung und Interaktion mit inhibitorischen Proteinen notwendige Rel-Domäne gemeinsam ist. Die Aktivität der Rel/NF- κ B-Proteine ist in den meisten Zellen strikt durch die inhibitorischen I κ B-Proteine reguliert. Diese Interaktion verdeckt die Kernlokalisierungssequenz von NF- κ B, wodurch es in inaktiver Form im Zytoplasma gehalten wird und interferiert zudem mit der DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors. Erst die Phosphorylierung von I κ B führt zur Ubiquitinylierung und anschließender Proteolyse. Außer über den TNF α -induzierten Signalweg, kann diese Phosphorylierung auch durch die Aktivierung von B-/T-Zell-Rezeptoren, bzw. durch NOD-Proteine (Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne) erfolgen. Für eine vollständige Aktivierung ist zudem eine weitergehende Phosphorylierung von NF- κ B bzw. seiner Untereinheiten durch Mitogen aktivierte Protein-Kinasen (MAPK) und Protein-Kinase C (PKC) erforderlich. Das vom Inhibitor befreite NF- κ B transloziert zum Nukleus und kann dort die Transkription seiner Zielgene induzieren (Abb. 3). Neuere Untersuchungen zeigen, dass der Rel/NF- κ B-Signalweg wichtige regulatorische Funktionen bei der Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose und der Onkogenese ausübt.

Nach dem Aufbau des Komplex I am Rezeptor kommt es zur Modifikation einiger seiner Komponenten und des Rezeptors selbst, bei der es sich möglicherweise um eine Ubiquitinylierung handelt. Dies führt dazu, dass der Komplex I vom Rezeptor dissoziiert und im Zytosol einen Komplex II bildet. Im Zytoplasma rekrutiert dieser Protein-Komplex FADD, Procaspase-8 und Procaspase-10 und initiiert dadurch den apoptotischen Signalweg.

Das Schicksal der Zelle wird dabei von den jeweiligen Mengen der beiden Komplexe bestimmt. Einen wichtigen Einfluss hierbei nehmen diverse Interaktionen an verschiedenen Stellen des apoptotischen Signalweges (siehe Abb. 3). Beispielsweise führt die Aktivierung von NF- κ B durch den Komplex I zur transkriptionellen Aktivierung von FLIP (CASPER), einem Caspase-8 Inhibitor. Die anti-apoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder Bfl-1/A1, Bcl-xL, NR13 und Bcl-2 blockieren die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Die bereits erwähnte Quervernetzung der beiden apoptotischen Signalwege wird dabei erneut deutlich. Mitglieder der IAP-Proteinfamilie wie XIAP, c-IAP1 und c-IAP2 können an Effektorcaspasen binden und sie blockieren [26].

Von entscheidender Bedeutung für das hier zu beschreibende Modell zur Identifizierung von TNF α induzierten Überlebensgenen war die Verfügbarkeit eines Modellsystems, in welchem

TNF α die NF- κ B-abhängige Überlebensmaschinerie aktiviert, ohne gleichzeitig Apoptose auszulösen. Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen, eine Cervixkarzinomzelllinie, eingesetzt. Die Behandlung von HeLa-Zellen mit TNF α führt nicht zur Apoptose. Erst bei einer zusätzlichen Blockade der Neusynthese von Proteinen, z.B. durch den Translationsinhibitor Cycloheximid, kommt es in den Zellen zum Zelltod. Das bedeutet, dass bei alleiniger Applikation von TNF α auf die Zellen, neue Gene transkribiert und translatiert werden, welche Einfluss auf die apoptotische Signalgebung nehmen und ein Überleben der Zellen gewährleisten. Können die von diesen Überlebensgenen kodierten Proteine nicht translatiert werden, gehen die Zellen in Apoptose. Damit steht ein System zur Verfügung, mit dem die Induktion von Überlebensgenen möglich ist und dadurch die Voraussetzung für ihre Identifikation schafft.

2.7 Identifizierung transient exprimierter Gene mittels einer Genfallenstrategie

Die Genfallen-Mutagenese wurde ursprünglich als eine Methode zur Identifizierung transkriptionell aktiver Regionen des Genoms in kultivierten Zelllinien angewendet [27]. Dabei handelt es sich um eine Art von ungerichteter Insertionsmutagenese, die auf der zufälligen Integration eines promotorlosen Reportergens in das Genom beruht [28, 29]. Dieses Verfahren ist erfolgreich bei der Mutationsanalyse von Genen nicht nur in der Maus [30, 31, 32], sondern auch in *Drosophila melanogaster*, in *Caenorhabditis elegans* und im Zebrafisch [33,34] etabliert worden.

Basierend auf der Expressionsregulation des Genfallen-Reportergens durch zelluläre Promotoren oder Enhancer, wurden eine Reihe von Genfallenstrategien entwickelt, die es ermöglichen spezifische Signaltransduktionswege zu untersuchen. Dazu gehört ein Verfahren, das Genfallen-Mutagenese und sequenzspezifische Rekombination kombiniert. Diese Strategie ermöglichte es, die durch einen biologischen Stimulus transient induzierten Gene zu identifizieren. Zur Identifizierung derartiger Gene war es erforderlich, den die Genfalle kontrollierenden Promotor von der Expression eines für die Selektion notwendigen Reportersystems zu entkoppeln [35]. Zu diesem Zweck wurde mit Hilfe einer Rekombinase-gesteuerten DNA-Excision, ein Austausch von Markergenen in einem Doppelselektionsvektor induziert. Die wesentlichen Schritte dieser Strategie sind in Abbildung 4 festgehalten.

Der große Vorteil des Cre/loxP-Systems liegt darin, dass schon die transiente Induktion von Cre ein permanentes Rearrangement im Selektionssystem zur Folge hat. Darüber hinaus

genügen schon sehr geringe Mengen der Rekombinase um die Rekombination auszulösen, so dass auch sehr schwach exprimierte Gene mit dieser Methode identifiziert werden können.

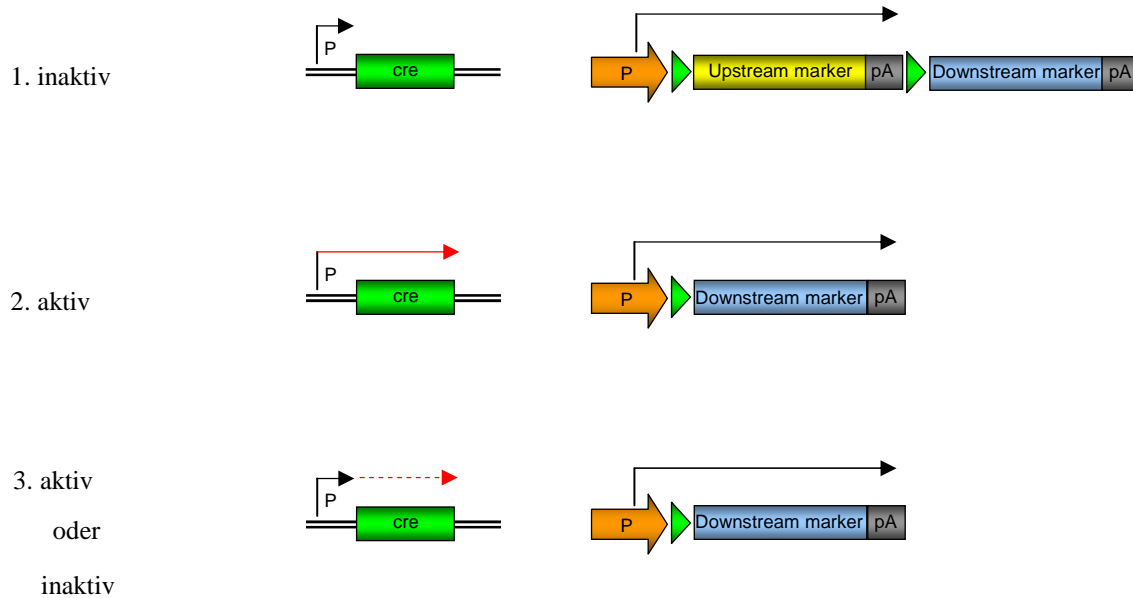


Abb. 4: Identifizierung transient induzierbarer Gene mit Hilfe von Genfallen-Mutagenese und sequenzspezifischer Rekombination. In HeLa-Zellen wird stabil ein Reportersystem eingebracht, welches zwei Markergene enthält. Das erste (gelb) wird flankiert von zwei loxP-Erkennungssequenzen und gesteuert von einem konstitutiv aktiven Promotor (orange). 3' dazu liegt das zweite Markergen, das in dieser Konstellation nicht exprimiert wird, da die Transkription an einer Polyadenylierungsstelle (pA) terminiert. Zellen die dieses Reporterkonstrukt stabil ins Genom inseriert haben, werden mit einer Cre-Genfalle transduziert. Bei einer Integration in aktive Gene wird Cre exprimiert und es kommt zur Rekombination und damit zur Deletion des ersten Markergens im Selektionsvektor. Bei der anschließenden Selektion auf das Vorhandensein dieses Gens werden somit alle Zellen mit Genfallen-Integrationen in aktive Gene eliminiert. In den überlebenden Zellen wird kein Cre exprimiert, da die Genfalle in inaktive Loci integriert ist (1.). Diese Zellen werden nun mit einem exogenen Stimulus induziert. Führt dies zur Aktivierung eines Gens in das die Genfalle integriert ist, wird Cre exprimiert und es kommt zur Rekombination (2.). Bei der anschließenden Selektion für die Aktivierung des zweiten Markergens (blau) überleben nur diese Zellen. Unabhängig von der Fortdauer der Cre-Expression, bleibt der Austausch der Markergene permanent erhalten (3.). Dies erleichtert die Identifizierung auch nur transient aktivierter Loci.

3 Ergebnisse

3.1 Genfallenstrategie zur Identifizierung TNF α -induzierter Gene

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Gene identifiziert werden, die als Folge einer TNF α -Induktion in einem HeLa-Zell Modellsystem exprimiert werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine HeLa-Reporterzelllinie mit einem stabil integrierten Doppelselektionssystem etabliert. Dieses System besteht aus zwei Antibiotikaresistenzkassetten, die so angeordnet sind, dass es nach einer erfolgreichen Cre-vermittelten Rekombination zu einem Umschalten der beiden Resistenzen kommt (Abb. 5).

Hinter dem konstitutiv aktiven Promotor des Maus Phospho-Glycerat-Kinase Gens (*PGK*), befindet sich eine von zwei gleichgerichteten *loxP*-Erkennungssequenzen flankierte Kasse, bestehend aus einem Puromycinresistenzgen (*puro*) und einer Transkription terminierenden Polyadenylierungssequenz (*pA*). Die 3'-Kassette besteht aus einem Neomycin-Phosphotransferase- β -Galaktosidase (*β geo*) Fusionsgen und einer weiteren *pA*-Sequenz (Abb. 5). In diesem Zustand des molekularen Schalters wird nur *puro*, nicht aber *β geo* exprimiert, weil das im *PGK*-Promotor initiiierende Transkript in der ersten *pA*-Sequenz terminiert. Entsprechend sind Reporterzellen, welche das Selektionsplasmid als stabiles Integrat enthalten, resistent gegenüber Puromycin (Puro^r) und sensitiv gegenüber Geneticin (G418; G418^s) (Abb. 5).

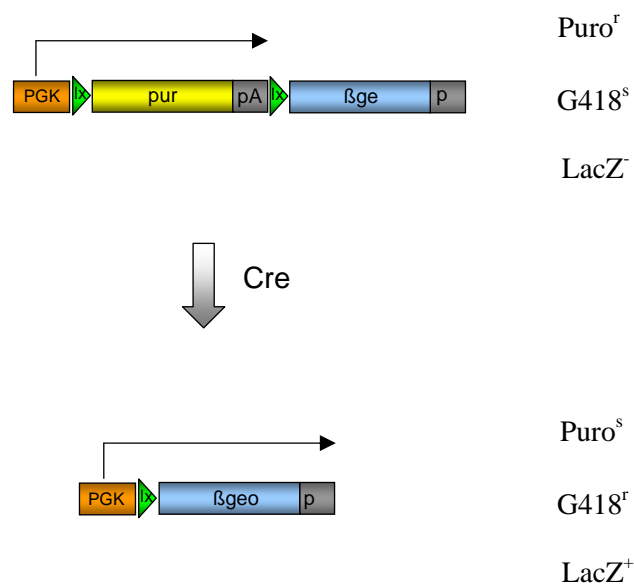


Abb. 5: Cre-abhängiges Doppelselektionssystem. Das Reporter-/Selektionskonstrukt ist schematisch dargestellt. Es besitzt zwei selektierbare Markergene, die von dem konstitutiv aktiven *PGK*-Promotor exprimiert

werden. In 5'-Position befindet sich das erste Markergen (*puro*) mit Transkriptionsterminationssequenzen (*pA*), flankiert von zwei *loxP*-Erkennungssequenzen (*lx*). 3' davon liegt das zweite Markergen, das für *βgeo* kodiert. *βgeo* wird in dieser Konstellation nicht exprimiert, weil die Transkription an der stromaufwärts liegenden Polyadenylierungsstelle abbricht. In Gegenwart von Cre-Rekombinase wird die Puromycin-Kassette deletiert. Dadurch gerät das *βgeo*-Gen unter die Kontrolle des *PGK*-Promotors und wird exprimiert. Dies konvertiert den ursprünglichen *puro*^r/*G418*^s-Phänotyp der Reporterzellen in einen *puro*^s/*G418*^r-Phänotyp.

Wird eine derartige Reporterzelle mit einer retroviralen U3Cre-Genfalle infiziert kommt es aufgrund des zufälligen Integrationsmusters von Retroviren unter anderem auch zu Insertionen in exprimierte und nicht exprimierte Gene. U3Cre-Insertionen in exprimierte Gene aktivieren die Cre-Expression. Dies führt zu einer Deletion des *loxP*-flankierten *puro*-Gens aus dem Doppelselektionsplasmid und zu einer gleichzeitigen Aktivierung des ursprünglich inaktiven *βgeo*-Gens.

Mit Hilfe dieses Umschaltens der Antibiotikaresistenz können aus einer repräsentativen Kollektion von Genfalleninsertionen, einer so genannten Insertionsbank, diejenigen Gene identifiziert werden, die selektiv von einem biologischen Stimulus (hier TNF α) induziert werden. Die einzelnen Schritte zur Identifikation der induzierbaren Gene sind in Abbildung 6 dargestellt. Wenn die Reporterzellen mit der retroviralen Genfalle infiziert werden kann diese entweder in transkriptionell aktive Loci (A) oder in transkriptionell inaktive (B, C) Regionen des Wirtszellgenoms integrieren. Die erste Selektion in Puromycin (Schritt 1) eliminiert sämtliche Zellen mit Insertionen in Genen, die zum Zeitpunkt der Infektion in den Zielzellen exprimiert werden (A), wie z.B. Haushaltsgenen. Zellen mit Insertionen in transkriptionell inaktiven Loci überleben, darunter auch diejenigen, bei denen sich die Genfalle in induzierbaren Genen befindet (B). Letztere werden dann in einem zweiten Schritt durch die Applikation des biologischen Stimulus (hier TNF α) induziert und können in G418 selektiert werden (Schritt 2), weil die Aktivierung der Genfalle die Zellen zur G418-Resistenz konvertiert.

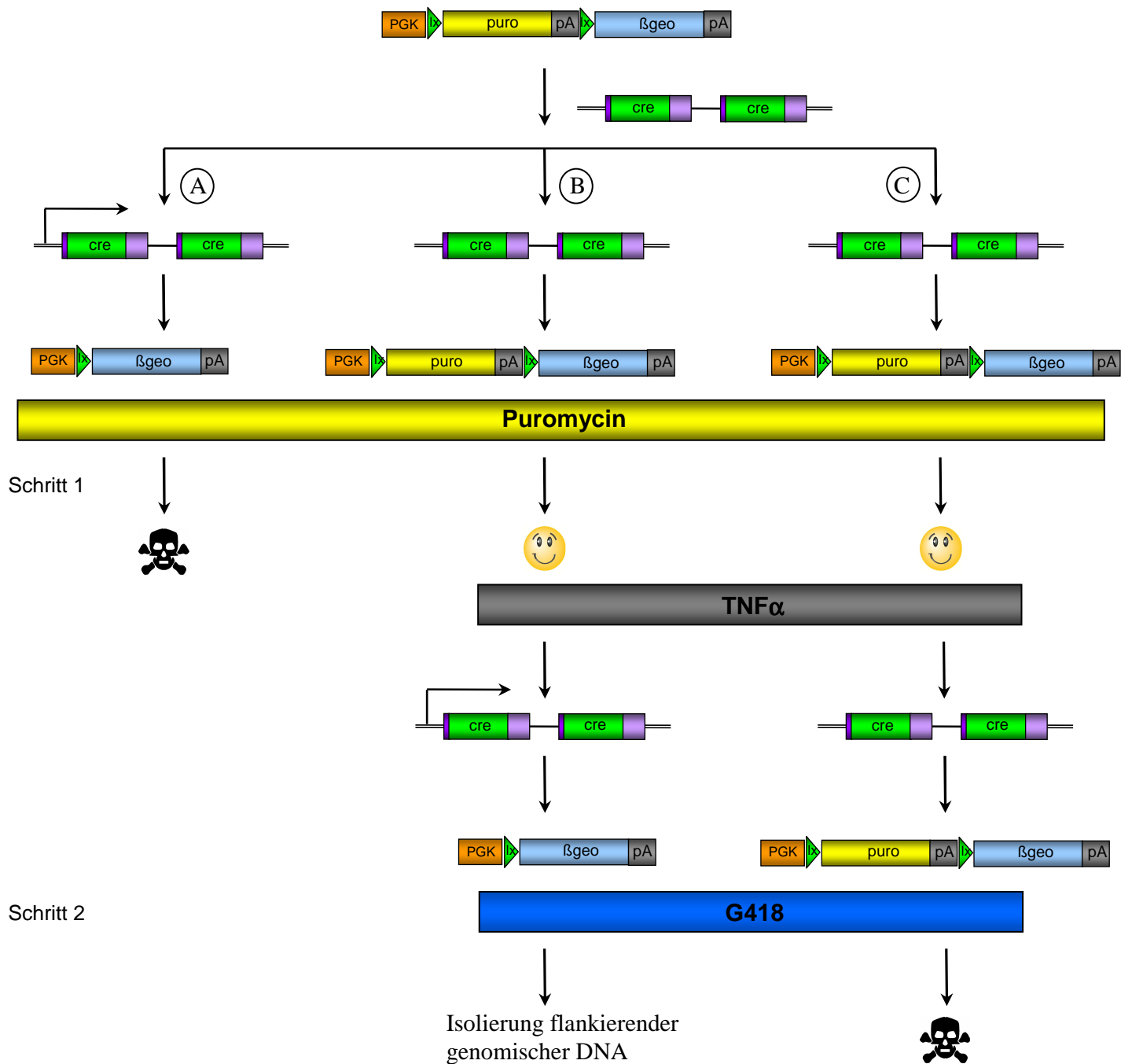


Abb. 6: Die Selektionsstrategie. Erläuterungen siehe Text.

3.2 Herstellung und Charakterisierung einer PGKlxpurolx β geo exprimierenden HeLa-Reporterzelllinie

Eine essentielle Voraussetzung für die Herstellung einer HeLa-Reporterzelllinie ist ein einwandfrei funktionierendes Reporterplasmid. Um die Funktionalität von PGKlxpurolx β geo (Abb. 5) zu überprüfen wurde das linearisierte Plasmid *in vitro* mit Cre-Rekombinase inkubiert. In Abbildung 7 sind die Rekombinationsprodukte dargestellt, die wie erwartet aus einem PGK β geopA und einem puropA-Fragment bestehen.

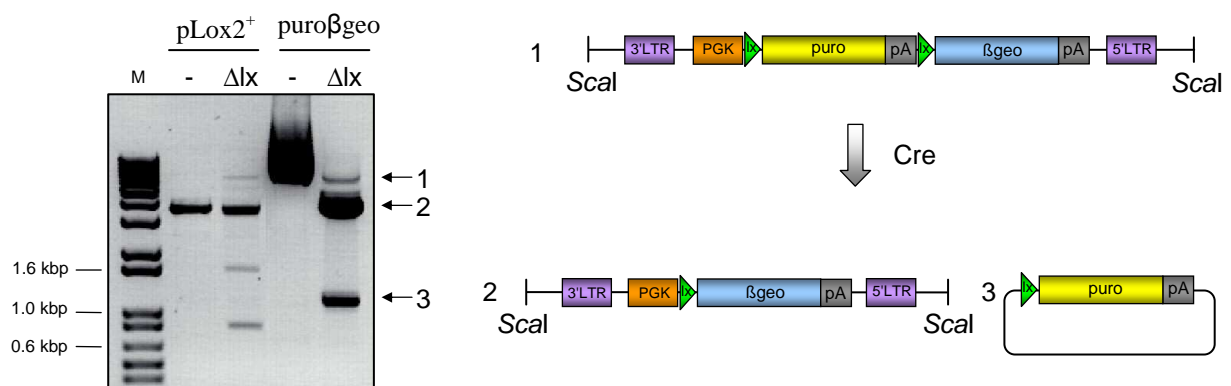


Abb. 7: *In vitro* Rekombination des PGKlxpurolx β geo-Selektionsvektors mit Cre-Rekombinase. 250 ng des Selektionsplasmides wurden mit dem Restriktionsenzym *ScaI*, das außerhalb der Selektionskassetten schneidet, linearisiert und parallel mit einem Kontrollplasmid (pLox2+), das eine "geflochte" Ampicillinresistenz-Kassette enthält, über Nacht mit 1 U Cre-Rekombinase bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden anschließend auf einem Agarose-Gel (0.7 %) aufgetragen. Beim Kontrollvektor resultieren aus der Rekombination (Δ lx) zwei Fragmente von 1.7 kbp und 0.85 kbp. Daneben ist beim rekombinierten Plasmid noch eine starke Bande zu erkennen, die in etwa auf der Höhe des Vektors vor der Rekombination liegt. Dies deutet auf einen nicht-rekombinierten Plasmidrest hin. Im Selektionsplasmid kommt es nach Bindung der Cre-Rekombinase zur Exzision eines ca. 1.1 kbp großen DNA-Fragmentes, das die *puropA*-Kassette (3) enthält. Das zweite resultierende Fragment umfasst die PGK β geopA-Kassette (2). Auch hier ist ein Rest an nicht-rekombinierter DNA erkennbar (1).

Im nächsten Schritt sollte das Reporterkonstrukt stabil in das Genom von HeLa-Zellen integriert werden. Dabei war es erstrebenswert eine einzige Kopie ins Genom zu integrieren, um mögliche *trans*-Rekombinationsereignisse zu umgehen, die bei Vorliegen mehrerer

Kopien auftreten könnten. Deswegen wurde hierfür eine retrovirale Transduktionsstrategie gewählt, bei der sich die Kopienzahl der integrierten Proviren leicht über das Verhältnis von Viruspartikeln zu Zielzellen ("multiplicity of infection", MOI) steuern lässt.

Die zur Herstellung von rekombinanten Viruspartikeln benötigten 293T Verpackungszellen wurden mit dem retroviralen Selektionsplasmid (pBABE PGKl \times purol \times β geo), in Kombination mit den für das Verpacken der viralen RNA in Retroviruspartikel benötigten Helferplasmide, kotransfiziert. Anschließend wurden mit den im Kulturüberstand enthaltenen Viruspartikeln HeLa-Zellen infiziert. Um sicherzustellen, dass die Infektion der Zellen bei extrem niedriger MOI erfolgte und damit Einzelkopieintegrationen in das Wirtszellgenom favorisiert wurden, wurden die infektiösen Partikel in vier seriellen Verdünnungen (1:10 bis 1:10000) zu den Zellen gegeben und in Puromycin selektiert. Auf der Schale mit 1:100 verdünntem Virusüberstand befanden sich 86 Klone, womit die MOI bei 5×10^6 infizierten Zellen ca. 2×10^{-5} betrug, so dass von einer Einzelkopieintegration ausgegangen werden konnte. Von dieser Platte wurden zehn Puromycin-resistente Klone isoliert und zur weiteren Charakterisierung expandiert.

Im Rahmen der folgenden Analyse dieser Reporterklone sollte ein geeigneter Klon ermittelt werden, der mit der Genfalle infiziert werden konnte. Dazu wurde überprüft, ob die Eigenschaften der Klone vor und nach einer Cre-induzierten Rekombination den Erwartungen entsprechen. Wie vorher beschrieben enthält das Reportersystem zwei Resistenzgene, wobei es nach der erfolgreichen Rekombination zu einem Umschalten der Antibiotikaresistenzen in den Klonen kommen sollte. Für die Auswahl eines geeigneten Reporterklons, sollte diese Änderung sowohl auf phänotypischer als auch auf genotypischer Ebene in den einzelnen Klonen überprüft werden. Für eine vollständige Charakterisierung musste zusätzlich noch die TNF α -Sensitivität des Reporterklons evaluiert werden.

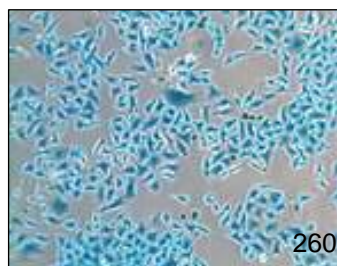
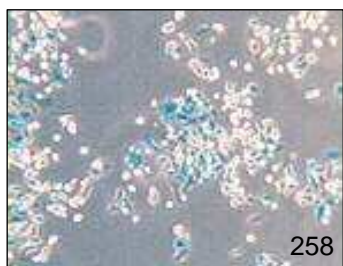
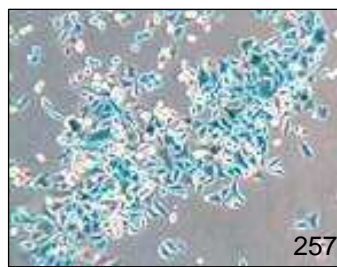
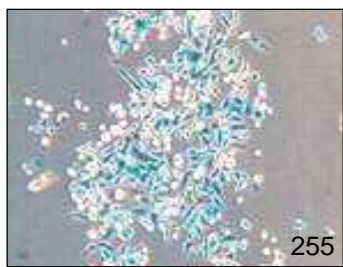
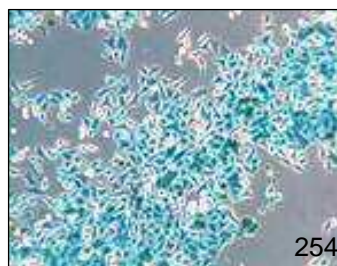
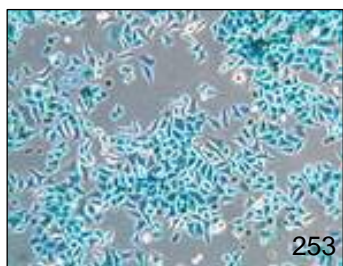
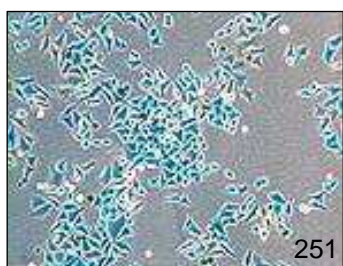
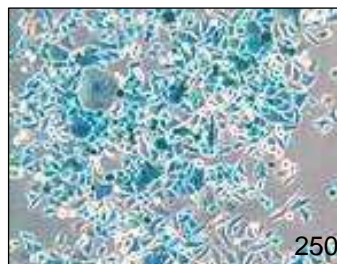
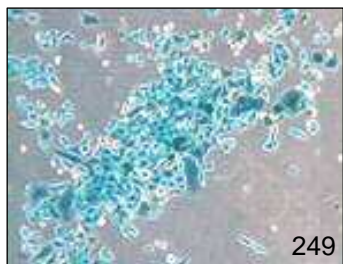
3.2.1 Phänotypische Charakterisierung der puro β geo-Reporterklone

In Abbildung 5 ist das von einem Reporterklon erwartete Verhalten vor und nach Rekombination schematisch dargestellt. Vor der Rekombination müssen die Klone sensitiv gegenüber G418 sein, weil die vom *PGK*-Promotor kontrollierten Transkripte an der ersten Polyadenylierungssequenz abbrechen. In diesem Zustand sollte nur das *puro*-Gen exprimiert

werden und in den Zellen dürfte keine β -Galaktosidase nachweisbar sein. Nach der Deletion der *puropA*-Kassette durch Cre-vermittelte Rekombination sollten die Zellen *β geo* exprimieren und dadurch sowohl G418-Resistenz als auch β -Galaktosidase Aktivität aufweisen.

Zunächst wurde die Sensitivität der Reporterklone gegenüber G418 getestet. Alle 10 isolierten Puromycin-resistenten Klone waren wie erwartet G418-sensitiv. Als nächstes wurde geprüft, ob es nach einer Cre-Expression in diesen Klonen zu der erwarteten Änderung der Antibiotikaresistenzen kommt. Hierfür wurden die Reporterklone mit einem Cre-Expressionsvirus infiziert und in G418 selektiert. Alle 10 G418-resistenten Derivate, der ursprünglich Puromycin-resistenten Klone wurden auf Puromycin-Sensitivität und β -Gal Expression getestet. Dabei zeigte sich, dass sämtliche G418-resistenten Derivate die Puromycinresistenz verloren hatten und variable Mengen an β -Galaktosidase exprimierten (Abb. 8). Wie auch in anderen Systemen wiederholt beschrieben, ist die interklonale Variabilität der β -Galaktosidase Expression wahrscheinlich auf chromosomale Positioneffekte zurückzuführen [36]. Hier kam es darauf an diejenigen Klone für weitere Experimente auszuwählen, die β -Galaktosidase möglichst gleichmäßig exprimieren.

A



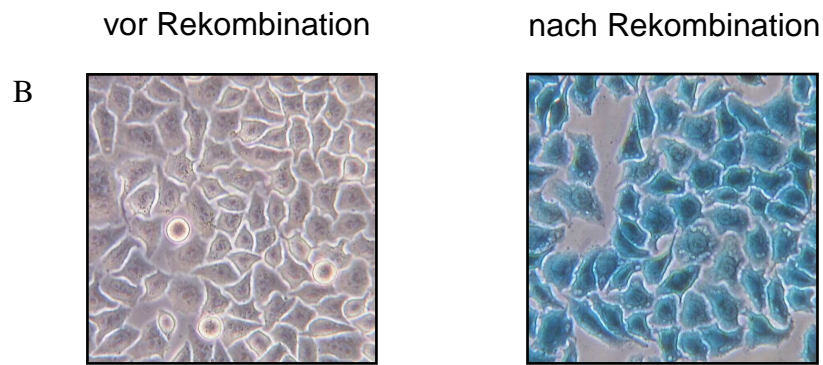


Abb. 8: β -Galaktosidase Aktivitätsnachweis in HeLa-Reporterklonen. 10 Klone wurden mit einem Cre-Expressionsvirus transduziert und in G418 selektiert. Ein Teil der Zellen wurde zum Nachweis der β -Gal Aktivität mit X-Gal angefärbt. **A:** Alle Reporterklone zeigen nach Cre-induzierter Rekombination den erwarteten Phänotyp in unterschiedlicher Ausprägung. **B:** X-Gal Färbung des Reporterklons 260 vor und nach Rekombination.

3.2.2 Genotypische Verifizierung der puoro β geo-Reporterklone

Zur Beantwortung der Frage ob die unterschiedlichen Phänotypen auf sequenzspezifischer Rekombination beruhen, wurden die zehn Puromycin-resistenten Klone und die daraus nach Cre-Transduktion abgeleiteten G418-resistenten Subklone molekulargenetisch untersucht. Hierfür wurden genomische PCRs entwickelt, die auf zwei Primerkombinationen basieren. Die erste umfasst Primer, die im *PGK*-Promotor und im *puro*-Gen liegen (*mpgkfor2/puroNTrev*). Die zweite benutzt Oligonukleotide im *PGK*-Promotor und im *β geo*-Gen (*mpgkfor1/geoB*). Wie in Abbildung 9 dargestellt, entstehen von nicht-rekombinierten Insertionen Amplifikationsprodukte mit beiden Primerkombinationen und zwar ein kurzes (0.6 kbp) (Abb. 9A) und ein langes (2.3 kbp) (Abb. 9B). Nach Rekombination hingegen entsteht kein Amplifikationsprodukt mit der ersten Primerkombination (9A) und ein kürzeres (1,1 kbp) Amplifikationsprodukt mit der zweiten Primerkombination (9B). Abgesehen von Klon 253, aus dem sich mit der zweiten Primerkombination das erwartete Rekombinationsprodukt nicht amplifizieren ließ, produzierten sämtliche Klone die vor und nach Rekombination erwarteten Amplifikationsprodukte (Abb. 9).

Aufgrund der Ergebnisse des phänotypisch/genotypischen Screens wurde der Klon HeLa260 als Zielzelle für alle folgenden Experimente gewählt, wobei die gleichmäßige und

vergleichsweise hohe β -Galaktosidase Expression nach Rekombination (Abb. 8B) ein wesentliches Auswahlkriterium war.

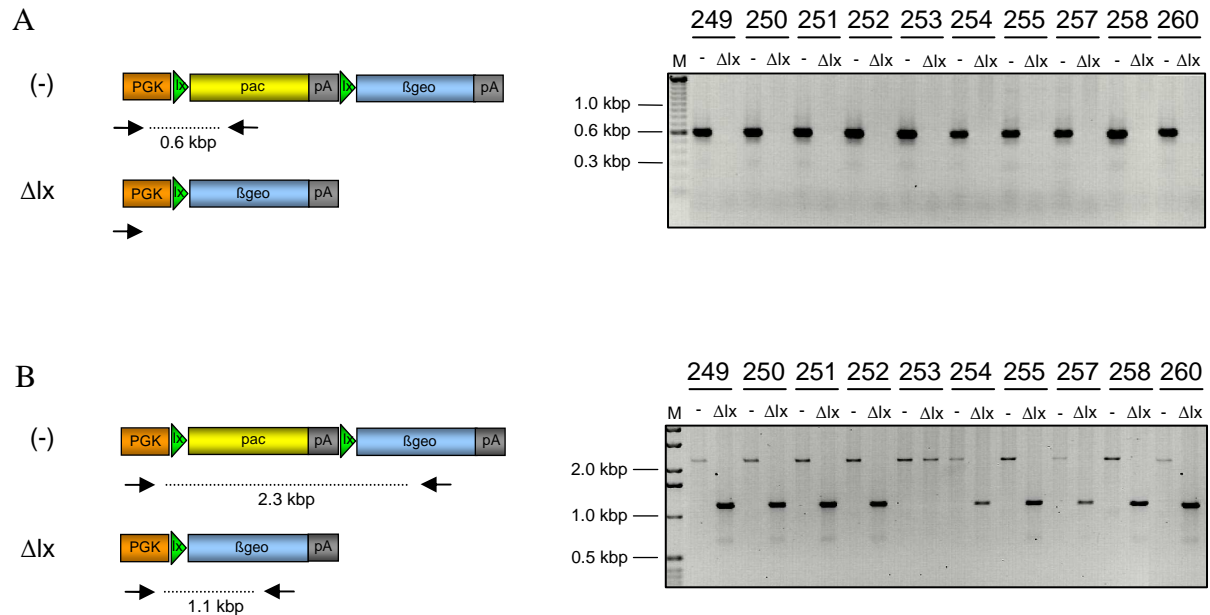


Abb. 9: PCR-Analyse der Cre-Rekombination in den Reporterklonen. Jeweils vor und nach Cre-induzierter Rekombination wurde DNA aus den Klonen bzw. ihren CRE-exprimierenden Derivaten isoliert. **A:** Mit der Primerkombination *mpgkfor2/puroNTrev* wurde in der PCR nur im nicht-rekombinierten Zustand (-) ein Fragment amplifiziert (0.6 kbp). Nach der Rekombination (Δ lx) und der Exzision des ersten Markergens fehlt das Template für den 3'-Primer, so dass keine Amplifikation möglich ist. **B:** Mit der Primerkombination *mpgkfor1/geoB* wird im nicht-rekombinierten (-) Zustand ein 2.3 kbp großes Fragment amplifiziert, das den Sequenzbereich vom Promotor bis in das zweite Markergen umfasst. Nach der Rekombination (Δ lx) befindet sich das *beta-geo*-Gen näher am Promotor, so dass ein kürzeres (1.1 kbp) Amplifikationsprodukt entsteht.

3.2.3 Nachweis der TNF α -Sensitivität von Klon 260

Weil es sich bei der Reporterzelllinie HeLa260 um ein klonales Derivat einer Zelllinie handelt, das möglicherweise Eigenschaften der Ausgangszelle verloren hat wurde zunächst die TNF α -Sensitivität der Reporterlinie überprüft. Hierfür musste berücksichtigt werden, dass HeLa-Zellen gegenüber TNF α -vermittelter Apoptose resistent sind (vgl. Kapitel 2.6) und somit bei Behandlung mit dem Zytokin kein phänotypischer Effekt messbar ist. Um dennoch Apoptose messen zu können wurden die Zellen zusätzlich zu TNF α mit Cycloheximid behandelt. Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass TNF α bei gleichzeitiger Blockade der ribosomalen

Proteinsynthese auch in HeLa-Zellen eine dosisabhängige Apoptose induziert. Beim Versuchsaufbau musste, neben der TNF α -Resistenz, noch ein weiterer Aspekt berücksichtigt werden. Cycloheximid alleine wirkt in hohen Dosen und bei langen Behandlungszeiten toxisch auf die Zellen. Aus anderen Projekten im Labor gab es allerdings Erfahrungswerte, die hier in Betracht gezogen wurden. Entsprechend wurden HeLa Wildtyp und HeLa260 Reporterzellen für 8 Stunden unterschiedlichen Konzentrationen TNF α mit und ohne Cycloheximid ausgesetzt. Nach Ende der Behandlung wurde die Zahl der überlebenden Zellen mit Hilfe des XTT-Tests bestimmt. Abbildung 10 zeigt, dass TNF α in Gegenwart von Cycloheximid in beiden Zellpopulationen zu einer dosisabhängigen Reduktion von überlebenden Zellen führt, während Cycloheximid und TNF α alleine darauf keinen Einfluss hatten. Interessanterweise reagierten die HeLa260 Zellen stärker auf TNF α als die Wildtypzellen, was für die bevorstehenden Genfallenexperimente von Vorteil war.

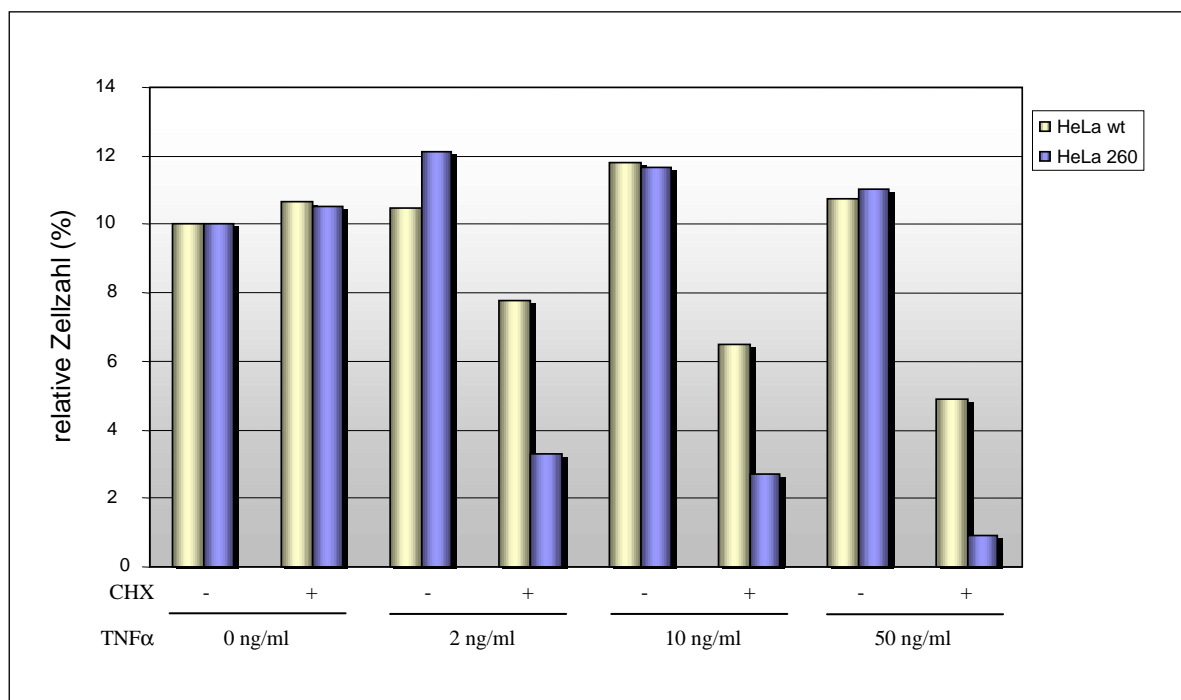


Abb. 10: TNF α -Sensitivität von HeLa260 Zellen. 3×10^4 HeLa260 Zellen (blau) und HeLa wt-Zellen (gelb), wurden für 8 Stunden drei verschiedenen Konzentrationen TNF α ausgesetzt. Apoptose wurde durch Hinzugabe von Cycloheximid (CHX; 10 μ g/ml) ausgelöst. Die relative Zahl überlebender Zellen wurde anhand ihrer metabolischen Aktivität mit dem XTT-Test ermittelt. Die Zellzahl in den unbehandelten Kontrollen wurde auf 100 % gesetzt.

3.3 Herstellung der Integrationsbank und Selektion für TNF α -induzierte Gene

Nachdem ein geeigneter Reporterklon identifiziert wurde, galt es mittels der U3Cre-Genfalle eine Integrationsgenbank herzustellen, um daraus die TNF α -induzierbaren Gene zu isolieren. Ziel dabei war es, möglichst viele unabhängige Genfallenintegrationen in die zelluläre DNA zu erzeugen, um eine repräsentative Verteilung und somit eine sättigende Mutagenese des Genoms zu erhalten. Entsprechend wurden die Infektionsbedingungen so angelegt, dass ca. alle 1000-5000 bp eine Genfallenintegration zu erwarten war. Unter der Annahme einer haploiden Genomgröße von 3×10^9 bp sind hierfür ca. $6 \times 10^5 - 3 \times 10^6$ unabhängige Integrationen notwendig. Allerdings basiert diese Annahme auf der Tatsache, dass der Retrovirus zufällig in das Genom der Wirtszelle integriert. Dies trifft jedoch nur eingeschränkt zu. *MLV* integriert bevorzugt in offene Chromatinregionen und dort speziell in promotornahe Sequenzabschnitte [37], so dass es unwahrscheinlich ist, auch bei perfekt eingestellten Infektionsbedingungen, eine Sättigung zu erreichen.

Um eine Integrationsbank der gewünschten Komplexität zu erhalten wurden 10^7 HeLa260 Zellen bei einer MOI von 0,5 mit U3Cre-Virus infiziert. Bei einer 100 % igen Infektionseffizienz, welche allerdings praktisch nicht ganz erreicht wird, sollte so eine Integrationsbank mit 5×10^6 unabhängigen Integrationen erhalten werden. Die infizierten Zellen wurden dann in einem ersten Schritt 10 Tage in Puromycin (1 μ g/ml) selektiert. Damit wurden sämtliche Zellen mit U3Cre-Insertionen in aktiven Genen eliminiert. Dazu gehören insbesondere die konstitutiv exprimierten Haushaltsgene. In einem zweiten Schritt wurde die Puromycin-resistente Zellpopulation mit TNF α behandelt, um diejenigen U3Cre-Insertionen zu aktivieren, die sich in TNF α regulierbaren Genen befinden. Weil letztere den molekularen Schalter in den HeLa260 Zellen aktivieren und diese zur G418-Resistenz konvertieren (vgl. Kapitel 3.1, Abb. 6) wurden in einem dritten Schritt die Zellen in G418 (1 mg/ml) selektiert. Die Integrationsbank wurde in zwei Parallelansätzen für 8 und 24 Stunden mit TNF α behandelt. Dadurch sollten auch die zu einem späteren Zeitpunkt aktivierten Gene identifiziert werden. Nach drei Wochen Selektion in 1 mg/ml G418 wurden 368 resistente Klone isoliert und für weitere Analysen expandiert. Von diesen überlebenden Klonen wurden 48 als Einzelklone analysiert. Der Rest wurde in 16 Pools zu je 20 Klonen expandiert und die Integrationsorte mittels einer Hochdurchsatz-inversen PCR charakterisiert [38]. Vorexperimente hatten gezeigt, dass die Ausbeute an insertionsspezifischen Amplifikationsprodukten bei 20 Klonen pro Pool am höchsten ist (ca. 70 %). Bei höheren Klonzahlen entstehen zwar mehr Amplifikationsprodukte, allerdings verringerte sich dabei auch der prozentuale Anteil identifizierbarer Integrationsorte. Aus der 8 stündigen TNF α -

Behandlung wurden 10 dieser Pools hergestellt, 6 weitere resultierten aus der 24 stündigen Behandlung.

3.4 Charakterisierung der Genfallen-Integrationsorte mittels inverser (i)PCR

Ausgehend von den bekannten Provirus-spezifischen Sequenzen, wurden die Genfalle-flankierenden genomischen Sequenzen (GTSTs, gene trap sequence tags) aus den G418-resistenten HeLa260 Zellpools und Einzelklonen amplifiziert. Dies geschah mittels inverser PCR mit Primern die Sequenzabschnitten im LTR und zwischen den LTRs entsprachen (Abb. 11). Hierfür wurde die DNA aus den Zell-Pools bzw. den Einzelklonen mit *Pst*I verdaut und die entstehenden Restriktionsfragmente, in einer Zirkularisierung favorisierenden Ligationsreaktion, zirkularisiert. In einer zweistufigen PCR (nested) wurden dann die 5'-flankierenden Sequenzen amplifiziert (Abb. 11).

Im Rahmen dieser Untersuchung stellte sich heraus, dass die inverse PCR für Einzelklone suboptimal war. Bei vielen Klonen wurden mehrere PCR-Produkte amplifiziert, wobei häufig virusinterne Kontaminationen vorlagen. Die Ursachen hierfür wurden nicht weiter untersucht, weil sich die DNA-Pool Strategie als überlegen erwies.

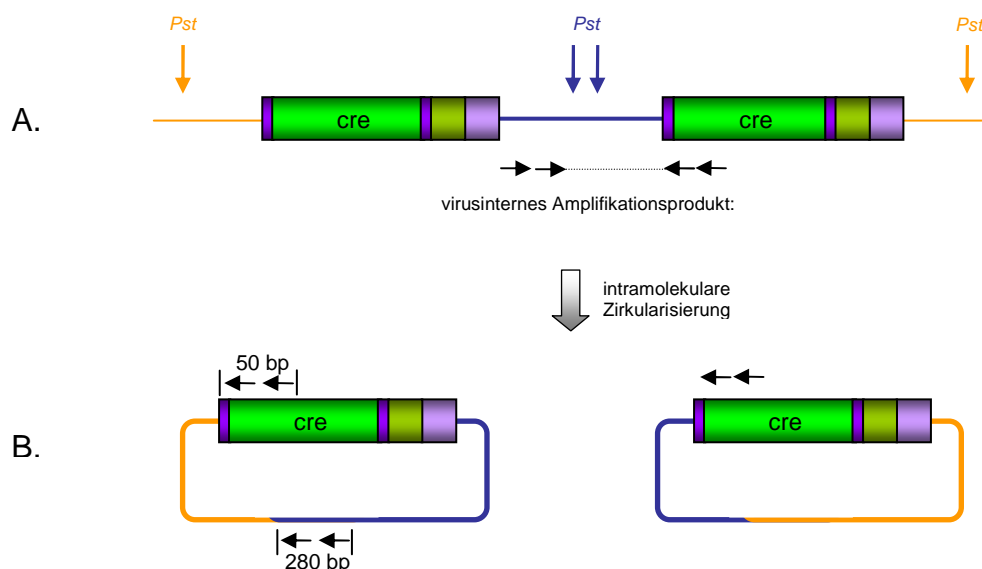


Abb. 11: Schematische Darstellung der iPCR Strategie. Dargestellt ist der integrierte Provirus (A) mit flankierender, zellulärer DNA. Genomische DNA wurde mit *Pst*I verdaut, das im Provirus zwischen den beiden LTRs und abhängig vom Integrationsort an unterschiedlichen Stellen in der flankierenden genomischen DNA (orange) schneidet. Die Restriktionsfragmente wurden anschließend unter Bedingungen, welche eine Zirkularisierung favorisieren, religiert und in einer zweistufigen PCR mit unterschiedlichen Primern (Pfeile) in

zwei nachgeschalteten Reaktionen ("nested PCR") amplifiziert (B). Sämtliche flankierende Sequenzen entsprechenden Amplifikationsprodukte sind größer als 0,33 kbp (Größe des proviralen Anteils im Amplifikat). Eine Produktgröße von 0,87 kbp entspricht einem virusinternen Fragment, das nach einem unvollständigen Restriktionsverdau entstehen kann.

Abbildung 12 zeigt die aus den 16 HeLa260 DNA-Pools erhaltenen Amplifikationsprodukte. Das unterschiedlich stark ausgeprägte Bandenmuster der einzelnen Pools ist deutlich zu erkennen. Die Anzahl der Banden korreliert mit der Effizienz der Reaktion und damit der Wahrscheinlichkeit genomische Zielsequenzen amplifiziert zu haben. Das ausgeprägteste Bandenmuster zeigt der Pool 9 mit 11 distinkten Fragmenten. Aufgrund der Tatsache dass jeweils 20 Klone einen Pool bilden, sollten theoretisch auch 20 distinkte Banden erwartet werden. Bei der Betrachtung der Ergebnisse wird deutlich, dass diese Zahl nicht erreicht wird. Dies legt die Vermutung nahe, dass entweder der Verdau unvollständig war oder in einzelnen Klonen dieser Pools Sequenzabschnitte neben der Genfalle liegen, die sich nicht effizient amplifizieren lassen. Möglicherweise ist dies auf einen hohen GC-Gehalt oder ausgeprägte Sekundärstrukturen in manchen Genen zurückzuführen. Die auffälligen 0,87 kbp Banden in den ersten zwei Pools sind auf einen unvollständigen *PstI*-Verdau zurückzuführen (Abb. 12). Zur weiteren Analyse wurden die 8 DNA-Pools mit den meisten distinkten Banden nach der iPCR ausgewählt und zwar die Pools 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 16.

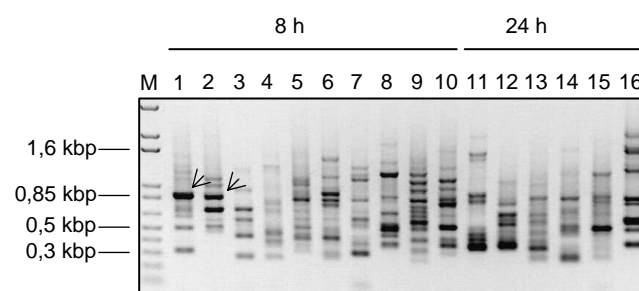


Abb. 12: Amplifikation von Provirus flankierenden, genomischen Sequenzen. Das Bild zeigt die iPCR Ergebnisse von 16 Zell-Pools. Eine Größe von mehr als 0,33 kbp deutet auf die Amplifikation von flankierender genomischer DNA hin. Fragmentgrößen von 0,87 kbp entsprechen virusinternen Amplifikationsprodukten. Besonders deutlich ist dies in den Pools 1 und 2 zu sehen (Pfeile). Die Spuren 1-10 zeigen Amplifikationsprodukte von Zellen nach 8 stündiger TNF α -Behandlung, die Spuren 11-16 enthalten Amplifikationsprodukte von Zellen nach 24 stündiger TNF α -Behandlung.

Zur Segregation der unterschiedlichen, flankierenden Sequenzen wurden die PCR-Produkte eines jeden Pools in einen Plasmidvektor (pGEM-T) kloniert und in *E. coli* transformiert. Umöglichst viele unterschiedliche, amplifizierte Fragmente zu identifizieren, wurden pro DNA-Pool 48 Bakterienkolonien isoliert und deren Inserts mittels einer Kolonie-PCR (siehe Methoden) identifiziert. In Abbildung 13 sind die mit Pool 7 erhaltenen Ergebnisse beispielhaft dargestellt. Hier konnten in 48 untersuchten Klonen 14 unabhängige Inserts identifiziert werden. In Pools 6, 9 und 16 befanden sich jeweils 17 unterschiedliche Inserts und im Pool 10 waren es 18. Insgesamt wurden 384 bakterielle Klone untersucht und 130 ausgehend von den proviralen Sequenzabschnitten sequenziert.

Tabelle 2 enthält eine Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse. Bei drei der acht untersuchten Pools (3, 5, 7) konnten über zehn unterschiedliche GTSTs identifiziert werden. Im Gegensatz dazu, ließen sich aus den Pools 10 und 16 nur 4 bzw. 2 genomische GTSTs gewinnen. Insgesamt entsprachen 60 der 130 sequenzierten Fragmente einmaligen GTSTs.

Zusammenfassend ergibt die Analyse klonierter iPCR-Fragmente folgende Bilanz: 8 DNA-Pools wurden untersucht, nach der Transformation der klonierten Fragmente in *E. coli* wurden 384 Kolonie-PCRs durchgeführt und 130 Fragmente sequenziert. Nach Abzug der in mehreren Klonen auftretenden identischen Sequenzen blieben 60, individuellen Genen entsprechende GTSTs übrig. Bei 8 untersuchten Pools von je 20 Klonen mit vermutlich insgesamt 160 Integrationen entspricht dies einer Ausbeute von 38 %.

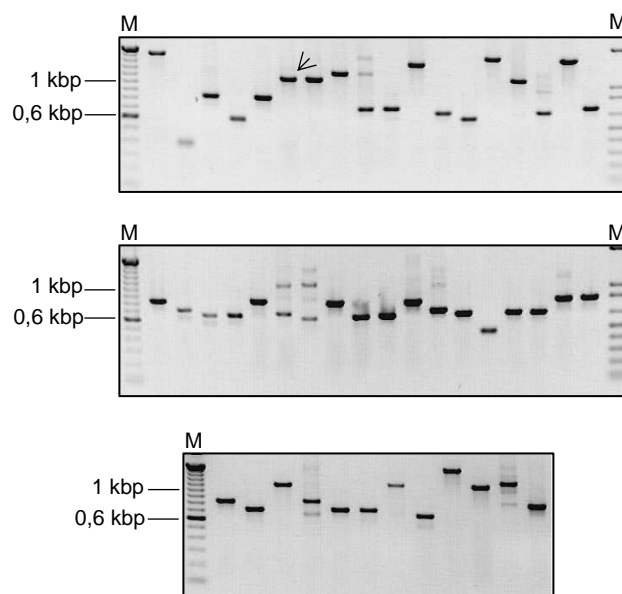


Abb. 13: Analyse von klonierten iPCR-Fragmenten, mit Hilfe einer Kolonie-PCR. Die in der iPCR amplifizierten Fragmente wurden in den Plasmidvektor pGEM-T kloniert und in *E. coli* transformiert. Für jeden

Pool wurden 48 Bakterienkolonien mit einer Kolonie-PCR untersucht. Dazu wurden die Primer univ (-47) und rev (-48) verwendet, die den pGEM-T Polylinker flankieren. Da zusätzlich zu den inserierten PCR-Fragmenten 0,27 kbp des Vektors amplifiziert wurden, wurden nur Fragmente über 0,6 kbp für eine Sequenzierung in Betracht gezogen. Fragmente von 1,14 kbp wurden ignoriert, da in diesem Fall ausschließlich virusinterne Sequenzen amplifiziert wurden (Pfeil).

DNA-Pool	sequenzierte Fragmente	unterschiedliche Sequenzen
3	13	11
5	13	10
6	17	6
7	14	13
8	21	6
9	17	8
10	18	4
16	17	2
Summe	130	60

Tab. 2: Zusammenfassung der iPCR Ergebnisse. Nach Analyse der transformierten Bakterienkolonien und der Größenanalyse mittels Gelelektrophorese wurden insgesamt 130 Fragmente sequenziert. Daraus ergaben sich 60 unterschiedliche Sequenzen für die anschließende Datenbankanalyse.

3.5 Datenbankanalyse der flankierenden Sequenzen

Zur Zuordnung der isolierten GTSTs wurde eine Datenbankanalyse durchgeführt. Hierfür wurden die NCBI (National Center of Biotechnology Information), EBI (European Bioinformatics Institute) und ENSEMBL v26 Sequenzdatenbanken benutzt. Nur GTSTs, die nach Entfernung der proviralen Sequenzen noch mindestens 30 Nukleotide enthielten wurden für die Sequenzhomologieuntersuchungen benutzt. Von 60 analysierten Sequenzen wiesen 53 GTSTs Homologien zu Datenbanksequenzen auf (Abb. 14). Hiervon befanden sich 24 in bekannten Genen, 3 in ESTs (expressed sequence tag) und 10 in "full length cDNAs" mit offenem Leseraster, denen bisher noch keine entsprechenden Proteine zugeordnet werden konnten. Besonders auffällig war die vergleichsweise hohe Anzahl von Sequenzübereinstimmungen (13) mit noch funktional uncharakterisierten, genomischen

Bereichen. Davon konnten in 10 Fällen, mit Hilfe einer Software zur Vorhersage potentieller Gene (GenScan), Exon/Intron-Strukturen in der Sequenz festgestellt werden. In drei Fällen handelte es sich ausschließlich um Homologien zu repetitiven Sequenzbereichen. Für 7 GTSTs wurden keine Homologien im Humangenom gefunden.

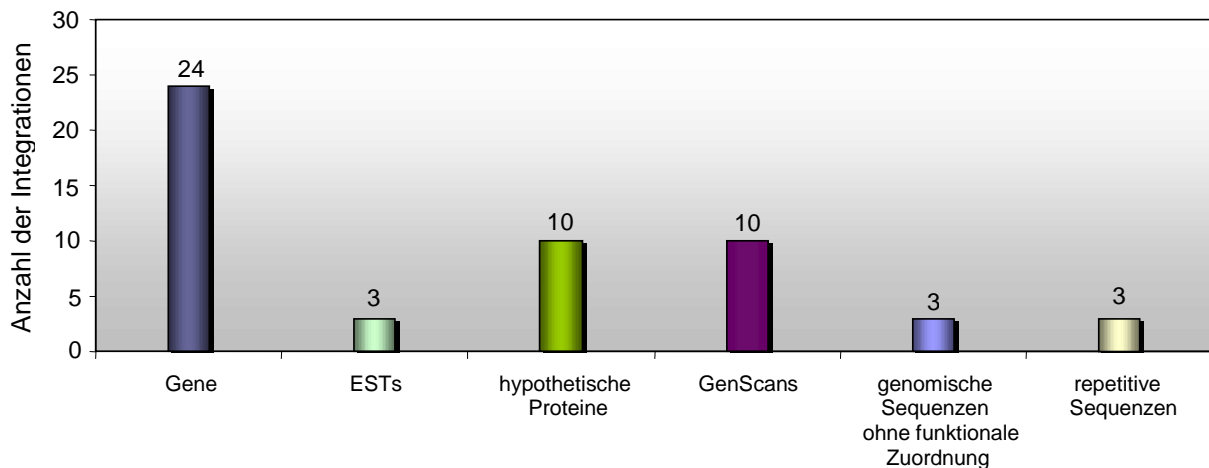


Abb. 14: Klassifizierung von Genfallen-markierten Sequenzen nach der Datenbankanalyse. (Erläuterungen siehe Text).

3.5.1 Lokalisation der U3Cre-Genfallenintegrationen

In Abbildung 15 sind die Lokalisationen der Provirus-Integrationen, sowie die Orientierung der Genfalleninsertionen innerhalb der identifizierten Loci dargestellt. Dazu wurden die Daten der 44 GTSTs in die Abbildung aufgenommen, bei denen eine präzise Charakterisierung bezüglich des Integrationsortes im Gen mit Hilfe der Ensembl-Datenbank möglich war. Dazu gehören alle Genfallenintegrationen in experimentell und hypothetisch (GenScan) annotierte Gene (siehe Tab. 3, Anhang).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Mehrzahl der U3Cre-Genfallen in die 5'-Enden von Genen integriert. Wie in Abbildung 15 dargestellt befinden sich 54 % (24 von 44) der Integrationen in den 5'-untranslatierten Regionen (5'-UTR), im ersten Exon oder im ersten Intron der getrappten Gene. Interessanterweise war die Mehrzahl der Genfalleninsertionen in Introns und nicht wie erwartet in Exons, obwohl die Genfalle keine Spleißakzeptorsequenzen hat. Dies liegt hauptsächlich darin begründet, dass Genfallen mit Reporter genen in der U3-

Region kryptische Spleißakzeptorsequenzen in den 5' zur Insertion liegenden Intronabschnitten aktivieren können. Als Folge davon entstehen Fusionstranskripte, die neben Exonsequenzen in Abhängigkeit von der Position der aktivierten Spleißakzeptorsequenzen auch mehr oder weniger Intronsequenzen enthalten [39]. Allerdings kommt es anders als bei Genfallen mit Spleißakzeptor, bei U3Cre nicht zur Expression eines Fusionsproteins, weil sich in der U3-Region ein Stopkodon im gleichen Leseraster mit dem Translation-initiiierenden AUG der Cre-Rekombinase befindet. Zusätzlich dazu befindet sich 3' vom 5'-LTR der U3Cre-Genfalle eine kryptische Spleißakzeptorsequenz, die beim Überlesen der *pA*-Sequenz des 5'-LTRs, was relativ häufig vorkommt (F. Wempe, persönliche Mitteilung), einen Spleißvorgang einleiten könnte. In einem Fall konnte ein derartig gespleißtes Transkript nachgewiesen werden (J. Altschmied, persönliche Mitteilung).

Während man früher vermutete, dass Retroviren zufällig in die Wirtszell-DNA integrieren, trifft dies heute nur noch bedingt zu. Mehrere Studien belegen, dass Retroviren bevorzugt in der Nähe von Transkriptionsstartregionen exprimierter Gene integrieren [37]. Die hier beschriebenen Ergebnisse bestätigen diese Präferenz.

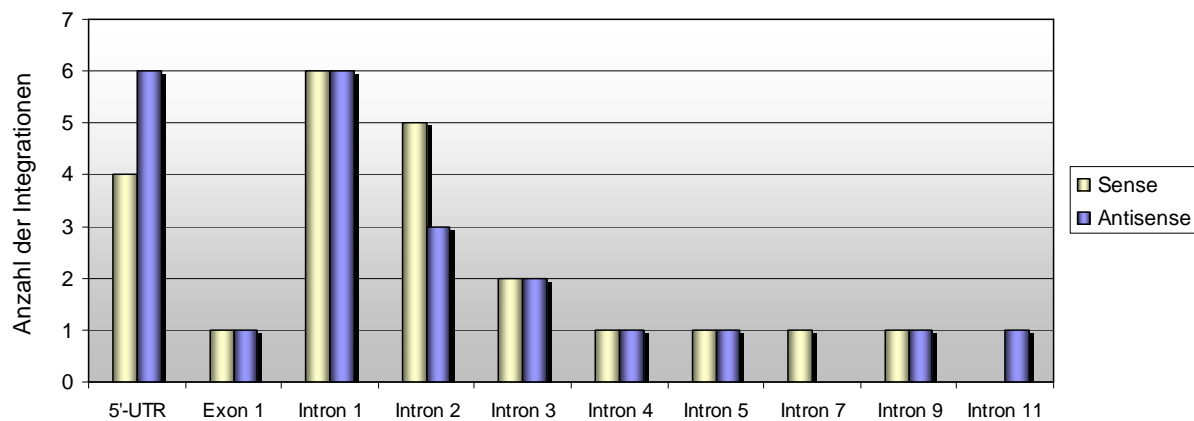


Abb. 15: Lokalisation der Genfallenintegrationen. Die Anzahl der Integrationen innerhalb der einzelnen Genorte wurden in absoluten Zahlen dargestellt, aufgeteilt nach Integrationen in sense- bzw. antisense-Orientierung. Es wurden die Genfallenintegrationen in bekannten Genen, annotierten "full length cDNAs", sowie die "GenScans" zugrunde gelegt.

3.5.2 Orientierung der U3Cre-Genfallenintegration

Zusätzlich zu den Integrationsorten ist auch die in Abbildung 15 dargestellte Orientierung der Genfallenintegrationen in den unterschiedlichen Loci von Interesse. Bei der Datenbankanalyse wurde deutlich, dass von insgesamt 47 untersuchten Integrationen in bekannte, nicht repetitive Sequenzbereiche, 24 in umgekehrter Orientierung, d.h. "antisense" (as) zur Transkriptionsrichtung des getrappten Gens vorlagen.

Weil die Aktivierung der U3Cre-Genfalle einen RNA-Polymerase-II Promotor voraussetzt, lag die Annahme nahe, dass sich in einer Reihe von Genen tatsächlich Polymerase-II Promotoren auf dem nicht-kodierenden antisense-Strang befinden. Um dieser Frage nachzugehen wurden die stromaufwärts von der as-Genfallenintegration liegenden Regionen (5 kb) auf ein mögliches Vorliegen von Polymerase-II Promotoren untersucht. Hierfür wurden drei frei verfügbare Promotor-Vorhersageprogramme eingesetzt und zwar das Neural Network Promoter Prediction Programm v2.2 (Berkeley Drosophila Genome Project; www.fruitfly.org/seq_tools/promotor.html), das Promoter 2.0 Prediction Server Programm (Technische Universität Dänemark, Lyngby; www.cbs.dtu.dk/services/promotor) und schließlich das Dragon Promoter Finder Programm, v 1.5 (Institute for Infocomm Research, Singapur; www.sdmc.lit.org.sg/promotor). Bei 10 (42 %) der untersuchten Klone ließen sich tatsächlich mit allen drei Programmen Promotorbereiche identifizieren, wobei von jedem einzelnen der gleiche Transkriptionsstart vorausgesagt wurde (Tabelle 3). Obwohl der experimentelle Beweis noch aussteht, ist bei einer Übereinstimmung von drei auf unterschiedlichen Algorithmen basierenden Promotorprädiktionsprogrammen das Vorliegen von Genfalle-aktivierenden Polymerase-II Promotoren auf den nicht-kodierenden antisense-Strängen der getrappten Gene sehr wahrscheinlich. Allerdings ist die Aktivierung der Genfalle von Promotoren, die in der Regel zwischen 2-4 kb stromaufwärts liegen (Tabelle 3), nur über die Aktivierung von kryptischen Spleißvorgängen denkbar.

Klone mit Genfallen-Integrationen in antisense-Orientierung	Transkriptionsstart (vorhergesagt) 5' vor der Genfalle
H-8-F381	2617 bp
H-8-K441	4639 bp
H-8-K481	4239 bp
H-8-L201	789 bp
H-8-L213	3100 bp
H-8-L227	4500 bp
H-8-M52	795 bp
H-8-M57	2027 bp
H-8-N152	1961 bp
H-24-Q269	2746 bp

Tab. 3: Identifikation von Transkriptionsstartregionen bei as-Genfallenintegrationen. Mit Hilfe von 3 unterschiedlichen Promotorprädiktionsprogrammen (Neural Network Promoter Prediction v2.2, Promoter 2.0 Prediction Server, Dragon Promoter Finder v1.5) konnten putative U3Cre-aktivierende Promotoren auf den nicht-kodierenden antisense-Strängen getrappter Gene identifiziert werden.

Cre-Rekombinase in Verbindung mit dem Doppelselektionssystem stellt ein sehr sensitives Reportersystem dar, da wenige Moleküle Cre für eine erfolgreiche Rekombination genügen. Deswegen reicht ein schwacher zellulärer Promotor bereits aus, um den molekularen Resistenzschalter zu induzieren. Dies macht die U3Cre-Genfalle zu einem geeigneten Werkzeug, niedrig exprimierte Gene zu identifizieren, deren Transkriptmengen unter den Nachweisgrenzen anderer Methoden liegen. Abgesehen davon lassen sich mit dem System unbekannte Transkripte, wie z.B. natürliche antisense-Transkripte (NATs) nachweisen. Dies ist bisher mit keinem der herkömmlichen Microarray-Systeme möglich, die sich alle vorwiegend auf bekannte Transkripte konzentrieren. NATs sind RNAs, deren Sequenzen komplementär zu anderen endogenen RNAs sind. Sie können sowohl vom entgegengesetzten Strang im selben genomischen Locus (*cis*), als auch von gänzlich anderen Loci (*trans*) transkribiert werden. Insbesondere bei *trans*-NATs mehren sich derzeit die Hinweise auf mögliche Funktionen bei der Regulation der Genexpression beim Menschen [40].

Bei den in dieser Arbeit identifizierten as-Transkripten könnte es sich auch um Vorläufer-Transkripte von micro-RNAs handeln, deren Prozessierungsprodukte zu der Gruppe *trans*-aktiver, nicht-kodierender NATs gehören. Solche miRNAs wurden erst in letzter Zeit als neue Klasse kleiner nicht-kodierender RNAs, mit potentiell regulatorischem Einfluss auf die

Genexpression beschrieben [41]. MiRNAs werden als Vorstufen (pre-miRNA) im Zellkern transkribiert. Nach dem Transport ins Zytoplasma und anschließender Prozessierung durch die RNase III Enzyme Drosha und Dicer, entstehen "reife" miRNA-Moleküle von etwa 18-25 bp Länge. Diese werden in den sogenannten RNA-Interferenz Komplex (RNA induced silencing complex, RISC) eingebaut. Durch Basenpaarung zwischen der miRNA und ihrem Target steuert RISC entweder den Abbau der mRNA oder inhibiert die Translation [42].

Für eine präzise Charakterisierung der hier identifizierten as-Transkripte sind weitere Experimente vonnöten. Insbesondere muss nachgewiesen werden, ob diese as-mRNAs auch tatsächlich existieren und nicht nur als Folge der Genfallenintegration induziert werden. Des Weiteren ist die Größe dieser Transkripte von Interesse. Zu diesem Zweck bieten sich strangspezifische Nachweismethoden wie z.B. RNase-protection-assays, Micro-Arrays mit strangspezifischen Oligonukleotid-Sonden oder Northern-Blots an. Bei Vorliegen von genspezifischen NATs könnte dann in einem zweiten Schritt, deren Einfluss auf die Expression des entsprechenden sense-Transkriptes untersucht werden.

3.5.3 Funktionelles Spektrum der getrappten Gene

Bei der funktionellen Einordnung der von den getrappten Genen kodierten Proteine wird deutlich, dass Mitglieder aus unterschiedlichen Proteinfamilien und Polypeptide mit verschiedenen Funktionen identifiziert wurden (Abb. 16). Dies liegt vermutlich darin begründet, dass TNF α als Hauptmediatorsubstanz bei inflammatorischen Prozessen ein sehr breites Spektrum an zellulären Reaktionen kontrolliert. Ein wesentlicher Teil dieser Gene hat metabolische Funktionen, dazu gehören z.B. verschiedene Enzyme. Zudem konnten 6 Gene identifiziert werden, welche bei der zellulären Signaltransduktion fungieren, was ebenfalls auf die pleiotropischen Effekte des Zytokins zurückzuführen ist. Beeinträchtigungen bei der Weiterleitung von Signalen spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese, weil sie apoptotische Prozesse verhindern könnten. Daher sind Signalgebende und –weiterleitende Moleküle, die nach einer Induktion von Überlebenswegen in der Zelle aktiviert werden, von besonderem Interesse. Interessanterweise wurden fünf Kandidatengene mit Funktionen im Zytoskelett oder der extrazellulären Matrix getrappt. Dabei ist in vielen Fällen noch wenig über Assoziationen dieser Gene zu TNF α -Signalwegen bekannt. Allerdings sind Zelladhäsionsmoleküle genauso wie Zytoskelettelemente, welche zum Teil auch an der Weiterleitung von Überlebenssignalen in die Zelle beteiligt sind, bei Prozessen der

Tumorgenese involviert und daher für eine weitere Validierung von Interesse. Des Weiteren wurden sechs Nukleinsäure-bindende Gene, welche für Transkriptionsfaktoren und Chromatin-organisierende bzw. Chromatinstruktur-modifizierende Proteine kodieren, identifiziert.

19 Genfallenintegrationen erfolgten in Bereiche des Genoms, denen noch keine Genprodukte mit eindeutig definierten Funktionen zugeordnet werden konnten. Der hohe Anteil an unbekanntem Transkripten kann möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass in den Genbanken vielfach stark exprimierte Gene überrepräsentiert sind. Dies ist dadurch bedingt, dass diese Datenbanken bisher identifizierte cDNAs und ESTs umfassen, deren Nachweis ein gewisses Expressionsniveau erfordert. Die U3Cre-Genfalle werden auch von schwachen, zellulären Promotoren angetrieben. Diese schwache Aktivierung kann anhand des Umschaltens in dem konstitutiv hoch aktiven Selektionssystem nachgewiesen werden. Damit bietet die Genfalle ein attraktives Werkzeug, um ergänzend zu cDNA-basierenden Methoden, schwach exprimierte und somit bisher unbekannte Gene zu identifizieren und möglicherweise auch bekannten Signalwegen zuzuordnen.

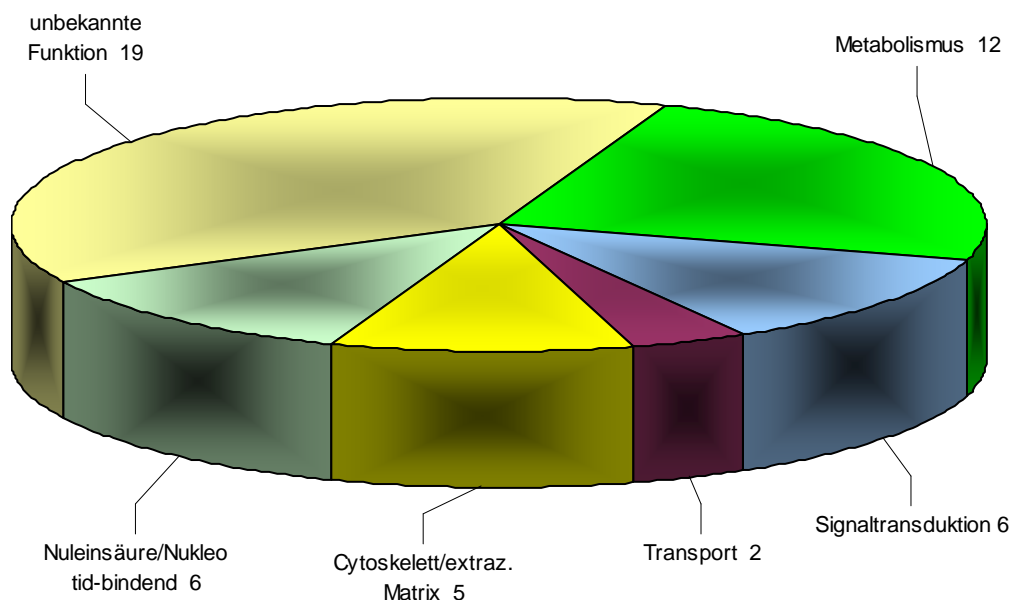


Abb. 16: Funktionale Zuordnung bekannter Gene und zuzuordnende Genvorhersagen. Genfallen-flankierte Sequenzen wurden einer Datenbankanalyse unterzogen, um Homologien zu bekannten Genen zu ermitteln. Die funktionale Zuordnung erfolgte nach den Vorgaben von "Gene Ontology" (www.geneontology.org).

3.5.4 Validierung von Kandidatengen

In einer ersten Annäherung wurde eine breit angelegte Literaturrecherche durchgeführt, um Gene zu identifizieren, die bereits im Kontext von Krebs bzw. Apoptose beschrieben wurden. Solche Gene waren für weitergehende Untersuchungen im Hinblick auf Aktivitäten beim Zellwachstum bzw. Funktionen, die das Überleben von Zellen beeinflussen besonders interessant.

In diesem Zusammenhang fielen einige Kandidatengene auf. Ein Beispiel dafür ist *caveolin-1* (*cav-1*). Das Proteinprodukt stellt die Hauptkomponente der sogenannten Caveolae-Strukturen in der Zellmembran dar. Innerhalb dieser Membraninvaginationen sind verschiedene Signalmoleküle konzentriert wie z.B. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Src-Kinasen, Protein-Kinase C-alpha und Ras-GTPasen. Es gilt als gesichert, dass *cav-1* Einfluss auf die Entwicklung von Tumoren beim Menschen hat [43]. Die genaue Funktion von *cav-1* konnte jedoch noch nicht exakt geklärt werden. CAV-1 wurde zuerst als Zielprotein von v-Src, in mit dem Rous Sarcom Virus transformierten Fibroblastenzellen identifiziert. Dies gab einen Hinweis auf eine mögliche Funktion von CAV-1 bei der Transformation von Zellen.

Ein weiteres interessantes Kandidatengen ist *atf-1* (activating transcription factor 1), das zur CREB/ATF-Subfamilie der bZIP (basic leucine zipper) Transkriptionsfaktoren gehört. Diese induzierbaren Transkriptionsfaktoren regulieren durch Binden an CREs ("cyclic AMP response elements") die Transkription von Genen. ATF-1 ist ein bekannter Translokationspartner des Ewing's Sarcoma Proteins (EWS) in t(12;22) Translokationen, wie sie sich z.B. bei Weichteil-Sarkomen finden [44]. Durch chromosomale Translokation entsteht ein Fusionsprotein zwischen dem Ewing's Sarcoma Protein (EWS) und *atf-1*. Solche charakteristischen Translokationen sind z.B. bei mesenchymalen Tumoren verbreitet, oft sind dabei Gene involviert die für Transkriptionsfaktoren kodieren. Die Eigenschaften solcher chromosomaler Abnormalitäten, ihre Assoziation zu spezifischen Zelltypen und ihr Auftauchen in somatischen Zellen, nicht aber in Keimzellen, lässt eine wichtige Funktion bei der Entwicklung von neoplastischen Veränderungen vermuten. Es ist derzeit nicht bekannt, ob EWS/ATF-1 oder andere Proteine, die aus Translokationen resultieren, die Proliferationsaktivität von Tumorzellen fördern. Bei Sarkomzellen konnte eine Aktivität, die das Überleben von Tumorzellen fördert, gezeigt werden.

Ein weiteres Gen mit Funktionen, welche möglicherweise die Proliferation von Zellen fördern, ist *ptp4a1*. Das Genprodukt gehört zu einer kleinen Gruppe von Protein Tyrosin-Phosphatasen (PTPs). Verschiedene zelluläre Prozesse wie Wachstum, Differenzierung und Metabolismus werden oft durch Protein-Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen, z.B.

durch PTPs reguliert. Überexpression von PTP4A1 in Säugerzellen führte zur Transformation und zur Tumorgenese bei Mäusen [45]. Über mögliche Signaltransduktionswege in denen das Gen eine Rolle spielt ist jedoch nichts bekannt. Das Gleiche gilt für übergeordnete Regulatoren und/oder Interaktionspartner bzw. mögliche Substrate.

Ein bekanntes Gen, dessen Proteinprodukt zu Prozessen die das Wachstum bzw. das Überleben von Zellen beeinflussen könnte ist *rhobtb3*. Das Protein gehört zu den Rho GTPasen, einer großen Familie von Proteinen mit regulatorischen Funktionen beim Zellwachstum und der Fähigkeit Zellen in Kultur zu transformieren [46]. Die spezifischen Funktionen des Gens selbst sind weitgehend unbekannt. Mitglieder dieser Familie sind jedoch in diversen Krebszelllinien hochreguliert, was auf Aktivitäten bei der Tumorgenese schließen lässt [47].

Ein letztes interessantes Gen für Untersuchungen im Hinblick auf seine Funktion bei der Tumorgenese ist *cbx4* (Chromobox Protein Homolog 4). Das Genprodukt ist Bestandteil des chromatinassoziierten Polycomb Komplexes. Normalerweise fungiert CBX4 als Repressor onkogenischer Aktivität. Verschiedene Studien mit überexprimierten bzw. mutierten Proteinderivaten zeigen jedoch, dass Störungen der Expression des Gens zur Bildung von transformierten Phänotypen führen. Diese sind auf eine Beeinträchtigung der Fähigkeit von CBX4 zurückzuführen die Expression von Onkogenen, vor allem *c-myc*, zu inhibieren [48].

3.6 Nachweis der TNF α -Regulation von Kandidatengenen

Die unter 3.5.4 beschriebenen Kandidatengene waren für weitergehende Untersuchungen im Hinblick auf Aktivitäten bei der Tumorgenese und mögliche antiapoptotische Funktionen besonders interessant. Neben einer ersten Vorauswahl durch bekannte Informationen aus der Literatur (vgl. 2.5) sollte auch experimentell, mit Hilfe einer Northern-Hybridisierung, die transkriptionelle Regulation dieser Gene durch TNF α verifiziert werden. Dazu wurden HeLa-Zellen mit TNF α für zwei bzw. vier Stunden behandelt, anschließend polyA⁺-RNA isoliert und in Northern-Blots mit spezifischen Gensonden hybridisiert. Mittels einer RT-PCR, bei der HeLa Wildtyp-RNA als Ausgangsmaterial verwendet wurde, konnten für jedes zu analysierende Gen spezifische Sonden hergestellt werden. In Abbildung 17 ist die Auswahl der Primer und die nach der RT-PCR amplifizierten Fragmente, aufgetragen auf einem Agarose-Gel, dargestellt.

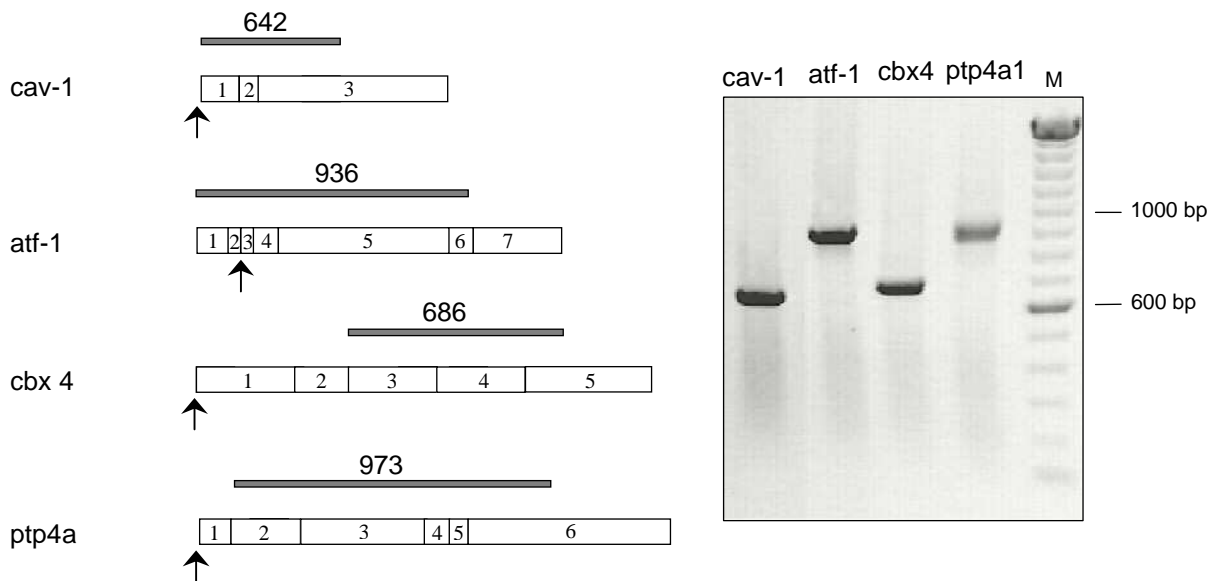


Abb. 17: Herstellen von genspezifischen Sonden. Für die Northern-Hybridisierung wurden mit Hilfe einer RT-PCR genspezifische Sonden hergestellt. Dazu wurden 2µg Gesamt-RNA aus HeLa wt-Zellen in die cDNA-Synthese eingesetzt und 10 % der synthetisierten cDNA in der anschließenden PCR verwendet. Die Lokalisation der Genfalle (Pfeile), sowie die Größe der generierten Sonden (graue Balken) sind schematisch dargestellt. Die nummerierten Rechtecke stellen die Exons der Gene dar. Die amplifizierten Fragmente wurden auf einem Agarose-Gel (1 %) aufgetrennt und analysiert.

In Abbildung 18 sind die Resultate der Northern-Blot Analyse dargestellt. Die Induktion durch $TNF\alpha$ führte zu einem unterschiedlichen Anstieg auf mRNA-Ebene. Am ausgeprägtesten ließ sich die *rhobtb3*-Expression induzieren. Insgesamt ist jedoch der mRNA-Anstieg nach $TNF\alpha$ -Behandlung nur schwach. Transientes "gene trapping" hat im Gegensatz zu alternativen Methoden (cDNA-Hybridisierungen) keine Präferenz für stark exprimierte Gene, daher können auch sehr schwach induzierte Gene identifiziert werden. Die Genfallenstrategie selektiert darüber hinaus für echte transkriptionelle Induktion und bleibt anders als übliche Methoden von einer posttranskriptionellen Regulation unbeeinflusst.

Besonders auffällig ist der Anstieg der mRNA-Expression bei *atf-1* und *rhobtb3* (Abb. 18 rot markiert), da diese Gene in as-Orientierung getrappt wurden. Dieses Resultat bestärkt die Annahme, dass zumindest in diesen Fällen tatsächlich ein as-Transkript gebildet wird, dessen Vorhandensein Auswirkungen auf die RNA des bekannten Gens haben könnte. Darüber

hinaus kann dies als Hinweis auf eine potentielle regulatorische Rolle von as-RNA, innerhalb der TNF α -Signaltransduktionskaskade interpretiert werden.

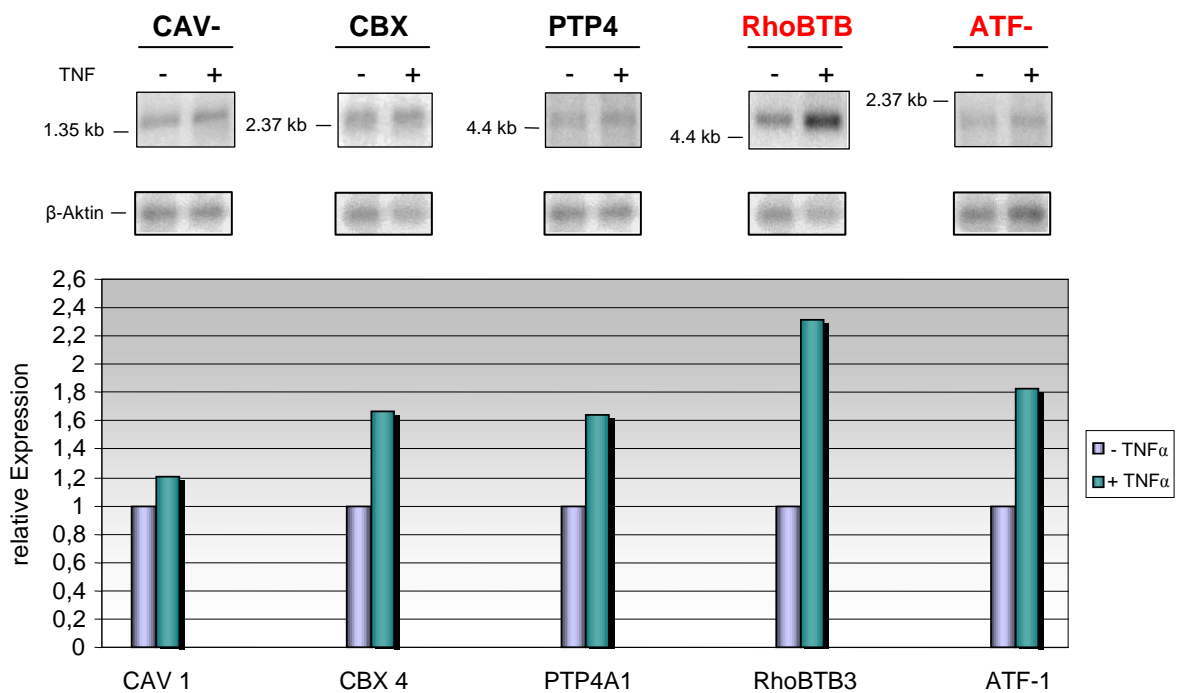


Abb. 18: Northern-Blot Analyse zum Nachweis der TNF α -Regulation von Kandidatengenen. HeLa-Zellen wurden mit TNF α (50 ng/ml) induziert. Nach 2 bzw. 4 h wurde polyA⁺-RNA (4 μ g) isoliert, auf einem 1,5 % Agarose-Gel aufgetrennt und per Kapillarblot auf eine Nylonmembran übertragen. Zur Hybridisierung wurden die genspezifischen Sonden aus Abb. 17 verwendet (Ausnahme: *rhobtb3*-Fragment, das freundlicherweise von F. Rivero zur Verfügung gestellt wurde), welche mittels einer asymmetrischen PCR in Anwesenheit von [³²P]-dCTP radioaktiv markiert worden waren. Nach Entfernung der Sonden wurde die Membran mit einer Aktinsonde rehybridisiert. Die Signale wurden im Phosphorimager detektiert und quantitativ ausgewertet. Die Intensität des Aktin-Hybridisierungssignals wurde dann zur Normalisierung herangezogen. Die Integration der Genfalle bei den Genen *atf-1* und *rhobtb3* (rot markiert) erfolgte in as-Orientierung.

Auf Basis der beschriebenen Resultate wurde deutlich, dass es mit der gewählten Strategie gelang, einige bezüglich ihrer Regulation durch TNF α validierte Kandidatenmoleküle für weitergehende funktionelle Analysen zu identifizieren.

4 Diskussion

4.1 Evaluation des Cre/loxP-Rekombinationssystems

Das pro-inflammatorische Zytokin TNF α spielt eine bedeutende Rolle als Hauptmediator-Substanz bei inflammatorischen Erkrankungen, rheumatoider Arthritis und Diabetes, sowie bei Prozessen der Tumorgenese. Dabei ist TNF α in der Lage, abhängig vom zellulären Kontext, sowohl Proliferation und Differenzierung, als auch Apoptose in Säugerzellen zu steuern. Diese gegensätzlichen Effekte sind auf die Fähigkeit des Zytokins zurückzuführen, verschiedene Signalwege in der Zelle zu aktivieren. In den hier eingesetzten HeLa-Zellen löst TNF α alleine keine Apoptose aus. Erst bei zusätzlicher Blockade der Neusynthese von Proteinen durch Cycloheximid kommt es zur Einleitung des programmierten Zelltodes in HeLa-Zellen. Dies weist darauf hin, dass der TNF α -Stimulus die Transkription von Genen aktiviert, deren Genprodukte in der Lage sind die apoptotische Signalgebung zu beeinflussen und letztlich Apoptose zu verhindern.

Mit Hilfe einer Kombination aus Genfallen-Mutagenese und sequenzspezifischer Rekombination sollten hier potentielle Überlebensgene identifiziert werden, die durch TNF α induziert werden. Dazu wurden HeLa-Zellen, die ein spezifisches Cre-Rekombinase abhängiges Reporterkonstrukt in ihrem Genom tragen, mit dem für Cre kodierenden, retroviralen Genfallenvektor U3Cre infiziert [49]. Aus einer aus 2×10^6 unabhängigen Insertionen bestehenden Integrationsbank wurden in einem zweistufigen Selektionsverfahren 50 HeLa-Zelllinien mit unabhängigen Genfalleninsertionen in TNF α -induzierbaren Genen isoliert. 23 dieser Integrationen befanden sich in funktionell noch nicht näher charakterisierten Genen. Trotz des mittlerweile umfangreichen Informationsgehaltes in Sequenzdatenbanken ist diese Strategie somit scheinbar geeignet, Gene mit noch bisher unbekanntem Funktionen zu identifizieren und bekannten Signalwegen zuzuordnen.

Unter den restlichen, bekannten Genen befanden sich keine, die bereits durch andere Methoden als NF- κ B regulierte Überlebensgene eingestuft wurden, wie z.B. *c-IAP*, *bcl-2* oder *c-Flip*. Dafür gibt es mehrere Gründe. Zum einen ist die Integrationsbank relativ klein und damit nicht repräsentativ für das Gesamtgenom. Zudem sind retrovirale Integrationen in das Genom einer Wirtszelle nur bedingt zufällig. Der hier als Vektor verwendete *Moloney murine leukemia virus (MMLV)* integriert präferentiell in die 5'-Enden transkribierter Gene. Des Weiteren dürfte eine hohe Basalexpression einiger der vorgenannten Gene, angesichts eines

hochsensitiven Selektionssystem (siehe unten), dazu führen, dass Zellen mit Integrationen in diesen Loci bei der Selektion gegen konstitutiv aktive Gene eliminiert werden.

Die eingesetzte Strategie identifiziert anders als die Mehrzahl Genexpression-untersuchender Verfahren nur die tatsächlich transkriptionell regulierten Gene und ist deswegen von posttranskriptionellen Einflüssen unabhängig. Der Cre-vermittelte Austausch zwischen zwei selektierbaren Markergenen ermöglicht darüber hinaus die Umsetzung einer transienten Geninduktion in einen stabilen, selektionierbaren Phänotyp als Folge einer Expressionsentkopplung des in der Genfalle gefangenen, endogenen Gens und des selektierbaren Markergens. Dies ist von großer Bedeutung, da die regulierten Gene nicht unbedingt permanent induziert sind. Die Identifizierung von Genen mit Hilfe der Cre/loxP-Strategie funktioniert zudem unabhängig von der Expressionsstärke des Genfalle-markierten Gens, weil die Gene des Reportersystems unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promoters (*PGK*) stehen. Die extreme Sensitivität des Cre/loxP-Systems führt dazu, dass nur wenige Moleküle Cre ausreichen, um eine Rekombination des Reporterkonstruktes zu induzieren. Im Gegensatz zu cDNA-Klonierungen werden deswegen mit dieser Strategie nicht bevorzugt stark exprimierte Gene identifiziert.

Die geringe Anzahl der nach Selektion und TNF α -Induktion gewonnenen, rekombinanten Klone (386 aus 2×10^6 oder 0.018 %) spricht für die Selektivität der Methode Gene zu isolieren, die durch einen gezielten, biologischen Stimulus (hier TNF α) induziert werden. Die Assoziation einiger dieser Gene mit der TNF α -Signaltransduktionskaskade validiert die benutzte Strategie zur Identifizierung TNF α -induzierter Überlebensgene. Insgesamt waren 42 % der getrappten Gene bzw. ESTs direkt oder indirekt mit der TNF α -Signaltransduktion assoziiert. Beispiele hierfür sind die Gene *cc3* und *caveolin-1*. CC3 ist eine Dehydrogenase und auch als dualer Apoptoseregulator bekannt, weil es sowohl eine pro-apoptotische (*cc3*), als auch eine anti-apoptotische Spleißvariante (*tc3*) gibt. Mit Hilfe von transienten Transfektionen in verschiedene Tumorzelllinien wurde nachgewiesen, dass TC3 Zellen vor Apoptose schützt, die durch CC3, durch Bax oder durch TNF α induziert wurde [50]. Allerdings sind die Mechanismen, die der pro-apoptotischen Aktivität von *cc3* zu Grunde liegen weitgehend unbekannt [51]. Ein zweites Beispiel ist Caveolin-1, ein integrales Membranprotein (siehe Kapitel 3.5.4). Die Funktion dieses Genproduktes beim Zelltod ist nach wie vor unbekannt. Dennoch scheint Cav-1 über die Interaktion mit verschiedenen Molekülen, die in die Überlebens-/Proliferations-Signalgebung involviert sind, wie z.B. dem EGF-Rezeptor (epidermal growth factor receptor) und der Src-Tyrosinkinase, eine wichtige

Rolle bei der Regulation des Zellwachstums zu spielen [52]. Interessanterweise konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass CAV-1 an das TNF-Rezeptor-assoziierte Adapterprotein TRAF2 bindet. Die funktionelle Konsequenz dieser Interaktion ist jedoch noch unklar [53].

4.2 Integration der Genfalle in antisense-Orientierung

Interessanterweise waren 50 % aller untersuchten Genfalleninsertionen in umgekehrter, transkriptioneller Orientierung zum getrappten Gen, was das Vorkommen natürlicher antisense-Transkripte vermuten lässt. Solche Transkripte enthalten Sequenzen, die komplementär zu anderen endogenen RNAs sind. In diesen Fällen liegt die Vermutung nahe, dass die Genfalle durch einen auf dem nicht-kodierenden Strang und stromaufwärts des Integrationslokus liegenden Promotor aktiviert wurde. Geht man von der hohen Sensitivität des Selektionssystems aus, würde bereits ein sehr schwacher Promotor zur Aktivierung der Genfalle ausreichen. Aktuelle Studien zeigen, dass bei Säugern nahezu das gesamte Genom transkriptionell aktiv ist und nicht wie bisher angenommen nur die 1 % Protein-kodierende Fraktion [54]. Dies legt die Vermutung nahe, dass vielfach auch nicht-kodierende RNA-Moleküle ein großes Spektrum an möglicherweise auch unerwarteten Funktionen bei Eukaryonten erfüllen. In weiteren Experimenten muss daher die Frage geklärt werden, inwieweit die in diesem Projekt identifizierten antisense-RNAs tatsächlich funktionelle Transkripte darstellen oder eher die Folge eines transkriptionellen Hintergrundrauschens ("transcriptional noise") sind [55]. Um Hinweise auf eine mögliche Funktion der hier isolierten antisense-Transkripte zu bekommen, wurden hierzu in einer ersten Annäherung die upstream-Sequenzbereiche der antisense-Integrationen *in silico* nach potentiellen Promotorsequenzen durchsucht. Dabei konnten in zehn Fällen Promotorsequenzbereiche bzw. Transkriptionsstartregionen übereinstimmend von drei unabhängigen Promotor Prädiktions-Programmen vorhergesagt werden. Dies unterstützt die Annahme, dass es tatsächlich zur Transkription von antisense-RNA kommt. Diese bioinformatische Analyse muss in Zukunft mit experimentellen Ansätzen validiert werden. Derartige Transkripte könnten beispielsweise über eine RACE-PCR genauer charakterisiert werden. Darüber hinaus könnten die potentiellen Promotorsequenzen durch Fusion an Reportergene und Transfektion in eukaryontische Zellen funktionell analysiert und dabei auch auf eine mögliche TNF α -Regulierbarkeit untersucht werden. Sollten sich dabei Hinweise auf aktive Promotoren ergeben, müssten in einem weiteren Schritt die natürlicherweise von diesen Promotoren

transkribierten RNAs, mittels strangspezifischen RT-PCRs, RNase-Schutzexperimente (Protections) oder Northern-Blots nachgewiesen werden.

Derzeit offen bleibt die Frage, um welche Klasse(n) von RNAs es sich bei den antisense-Transkripten handeln könnte. In diesem Zusammenhang zeigen verschiedene Arbeiten aus jüngster Zeit interessante Entwicklungen. Neben dem Nachweis der hohen transkriptionellen Aktivität im humanen Genom, wird immer deutlicher, dass RNA-Moleküle äußerst vielseitig sind. Dies ist vor allem auf ihre chemischen Eigenschaften zurückzuführen, die es ihnen erlauben komplexe Sekundär- und Tertiärstrukturen zu bilden, mit deren Hilfe verschiedene Funktionen, einschließlich enzymatische, ausgeführt werden können [56]. Darüber hinaus können RNAs mit verschiedenen Proteinen interagieren und so genannte Ribonuklein-/proteinkomplexe bilden, die spezifische RNA- oder DNA-Sequenzen binden können und damit Einfluss auf die Genregulation in eukaryontischen Zellen nehmen [57]. Daher ist anzunehmen, dass RNA-Molekülen eine größere Bedeutung in Säugerzellen zukommt als bislang angenommen.

Interessanterweise wurde gerade in letzter Zeit eine unerwartet große Zahl nicht-kodierender RNAs in eukaryontischen Zellen identifiziert und beschrieben. Zu diesem Zweck werden verschiedene Strategien wie z.B. die direkte Sequenzierung nicht-kodierender RNAs, die Herstellung spezieller cDNA-Banken aus nicht-kodierenden RNA-Sequenzen und die Verwendung von Microarray-Analysen zur Identifizierung nicht-kodierender RNAs, die unter experimentellen Bedingungen exprimiert werden, eingesetzt [58]. Die Identifizierung neuer, nicht-kodierender RNAs auf bioinformatischem Weg stellt sich als schwierig dar, da ihnen im Gegensatz zu Protein-kodierenden Genen typische Sequenzeigenschaften, wie Start- und Stop-Kodons fehlen. Damit sind auch Ansätze, die Frameshift- bzw. nonsense-Mutationen berücksichtigen und zur Analyse Protein-kodierender Gene angewandt werden wirkungslos. Da auch nicht klar ist, ob nicht-kodierende RNAs gespleißt und polyadenyliert werden, können auch diese Kriterien nicht notwendigerweise zur Vorhersage eingesetzt werden. Vor diesem Hintergrund bietet der hier eingesetzte Genfallen-Ansatz die zusätzliche Möglichkeit weitere, bisher noch nicht entdeckte RNA-Moleküle zu identifizieren, welche dann experimentell verifiziert werden können.

Anhand ihrer Größe werden diese nicht-kodierenden Transkripte in drei Klassen unterteilt: mikroRNAs (21-25 Nukleotide), kleine RNA-Moleküle (100-200 Nukleotide) und große nicht-kodierende RNAs (> 1000 Nukleotide). Dabei rücken derzeit vor allem die mikroRNAs in den Blickpunkt, die Funktionen bei verschiedenen Schritten der Differenzierung und Entwicklung in Säugerzellen ausfüllen. Untersuchungen mit Modellorganismen wie

Caenorhabditis elegans deuteten bereits darauf hin, dass sie hauptsächlich die Translation ihrer mRNA-Zielmoleküle beeinflussen [59]. MiRNAs werden mittels RNA-Polymerase II als primäre Transkripte, den sogenannten Primär-miRNAs generiert und können bis zu mehrere Kilobasen umfassen [60]. Die eigentliche miRNA ist innerhalb dieser Primär-miRNA, in einer 60-80 Nukleotide umfassenden Sequenz enthalten und kann eine Haarnadelstruktur bilden, welche durch das RNase III Enzym Drosha erkannt und herausgeschnitten wird. Anschließend werden die so prozessierten RNAs ins Zytoplasma exportiert und durch das RNase III Enzym Dicer in ca. 21-25 Nukleotide umfassende Duplices umgewandelt. Diese fertig prozessierten Duplices werden vom Enzymkomplex RISC (RNA-induced silencing complex) aufgenommen. RISC baut eine Hälfte des RNA-Doppelstranges ab, bindet mit Hilfe der anderen Hälfte an das komplementäre mRNA-Transkript. Dabei führt ein so genannter "perfect match" der miRNA zur targetRNA zum Abbau, ein nicht-perfekter "match" dagegen zur Translationsinhibition. Kürzlich wurde eine Studie veröffentlicht, in der die Autoren die Wirkmechanismen von miRNAs in HeLa-Zellen detailliert untersuchten [61]. Dabei zeigte sich, dass miRNAs vor allem die initiale Phase der Translation zum Ziel haben. Durch Interaktion mit Sequenzen der 3'-UTRs wird die Translation von Ziel-mRNAs reprimiert [62]. Dabei wurde deutlich, dass miRNAs den initialen Schritt der Translation, durch Assoziation an das Cap-bindende Protein des eukaryontischen Initiationsfaktors eIF4E stören und damit letztendlich die Translation unterbinden.

Inzwischen sind mehr als 3000 miRNAs bei Tieren, Pflanzen und Viren identifiziert worden. [63]. Im menschlichen Genom sind bislang mehr als 300 miRNAs bekannt. Aktuelle Schätzungen nach kodieren 2 % der bekannten humanen Gene für mikroRNA-Moleküle [64]. Viele der mittlerweile in *C. elegans*, *Drosophila* und bei Säugern identifizierten miRNAs sind hochkonserviert, mit einer Sequenzübereinstimmung von bis zu mehr als 90 % zwischen Mensch und Maus [65]. Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, dass viele miRNA-Genfamilien in den verschiedenen Organismen eine vergleichbare, genomische Organisation und ähnliche Expressionsmuster aufweisen [66]. In mehreren Studien aus jüngster Zeit konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Expression von miRNA-Genen bei verschiedenen Krankheiten des Menschen verändert ist. Von besonderem Interesse sind dabei veränderte Expressionsmuster einiger spezifischer miRNA-Gene welche zur Initiation und Progression von Krebs beitragen. Die Bedeutung derartiger nicht-kodierender Transkripte wird am Beispiel eines bekannten miRNA-Clusters, dem miR-17-92 Polycistron auf Chromosom 13 deutlich. Mit Hilfe von Microarray-Expressionsanalysen verschiedener humaner Tumoren,

sowie im Mausmodell konnte eine verstärkte Expression des miR-17-92 Clusters in folliculären B-Zell Lymphomen festgestellt werden. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass dieser Expressionsanstieg mit einer erhöhten Myc-Expression einhergeht und damit die Bildung von Lymphomen in der Maus fördert. Tumore mit Hochregulation des miR-17-92 Clusters entwickeln eine erhöhte Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli [67]. Die Veränderungen der miRNA-Expression zwischen Tumorgeweben und normalen Geweben können für prognostische und diagnostische Zwecke im klinischen Bereich von Interesse sein. Allerdings sind für die Mehrzahl der miRNAs die entsprechenden Zielgene, sowie die beeinflussten Signalwege noch weitaus unbekannt.

Zur zweiten Klasse nicht-kodierender RNAs gehören kleinere RNA-Moleküle (100-200 Nukleotide) mit regulatorischen Effekten bei der Translation. Trotz ihrer Sequenzlänge unterscheidet sich diese Klasse von den Primär-miRNAs und unterliegt nicht den gleichen Prozessierungsmechanismen wie bei den beschriebenen miRNAs. Beispiele für derartige RNAs sind die Transkripte der Gene *his-1* [68] und *bic* [69]. Insbesondere die Expression von *bic* scheint von Interesse zu sein, da deren Hochregulation bei metastatischen Tumoren mit einer verstärkten Aktivierung von *c-myc* gekoppelt ist.

Zur dritten Klasse von nicht-kodierenden RNA-Molekülen gehören Transkripte, die als funktionelle RNAs aus über 1000 Nukleotiden bestehen und ebenfalls in "gene silencing" involviert sind [70]. Ein Beispiel für die Funktion einer solchen nicht-kodierenden RNA in einem natürlichen Prozess ist die Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen in somatischen Zellen weiblicher Säuger. Sie wird von dem sogenannten X-Inactivation center (*Xic*), einem komplex aufgebauten Locus auf dem X-Chromosom, kontrolliert. Von dem in *Xic* liegenden *Xist*-Gen wird eine große, nicht-kodierende RNA transkribiert, die das X-Chromosom bedeckt und so eine Stilllegung einleitet. Wegen seiner essentiellen Funktion in der Gendosis-Kontrolle, muss *Xist* selbst genauestens reguliert werden. Dies geschieht über eine antisense-RNA (*Tsix*), die über ihre gesamte Länge mit dem *Xist*-Transkript überlappt. *Tsix* ist in der Lage die *Xist*-RNA zu blockieren und damit das X-Chromosom vor silencing zu schützen. Ob *Tsix* *Xist* auf Ebene der Transkription oder RNA-Stabilität reguliert ist noch nicht geklärt [71]

Nicht-kodierende RNA-Moleküle scheinen im Transkriptom weiter verbreitet zu sein als bisher angenommen [72]. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass nicht-kodierende RNA-Moleküle, insbesondere miRNAs, zur Krebsentstehung bzw. -progression beitragen. Speziell solche RNAs mit pro-proliferativen oder anti-apoptotischen Funktionen könnten die

Tumorentwicklung fördern und in Krebszellen überexprimiert sein. So konnten einige dieser RNA-Moleküle bereits Regionen im humanen Genom zugeordnet werden, die in Tumorzellen Veränderungen zeigen. Beispiele dafür sind DD3 auf Chromosom 9q21-22 [73] und PCGEM auf Chromosom 2q32 [74]. Beide nicht-kodierenden Transkripte sind in Prostatakarzinomen überexprimiert. Ein weiteres Beispiel ist BC200 auf Chromosom 2p16, dessen Transkript in Brust- bzw. Cervixkarzinomen hochreguliert ist. Diese Resultate unterstreichen die potentielle Bedeutung von nicht-kodierenden Transkripten bei der Tumorgenese. Daher ist die weitere Erforschung der Funktionen dieser RNA-Moleküle bei unterschiedlichen Formen von Krebs von großem Interesse.

Die Frage nach der Klassifizierung der hier identifizierten, potentiellen antisense-Transkripte ist schwierig zu beantworten. Der hohe Prozentsatz an Genfallen-Integrationen in antisense-Orientierung ist wahrscheinlich auch auf die Stringenz der Selektionen für Integrationen in TNF α -regulierte Gene zurückzuführen. Bei der Interpretation muss ebenfalls berücksichtigt werden, dass der *MMLV*-Virus präferentiell in die 5'-Regionen, aktiv transkribierter Gene integriert. Unabhängig von der Natur der getrappten antisense-RNA bleibt der Mechanismus der Genfallen-Aktivierung, auch im Falle einer Integration in umgekehrter Orientierung zum annotierten Gen, bestehen. Es ist denkbar, dass speziell die vorherrschenden Integrationen in der Nähe der 5'-Regionen, hier 54 % aller Genfallen-Integrationen, auf Aktivitäten bidirektionaler Promotoren hinweisen oder aber ein Indiz für das Vorhandensein eines langen Transkriptes innerhalb des Gens darstellen. Bidirektionale Promotoren steuern die Transkription von so genannten Transkriptpaaren, welche jeweils vom (+)- bzw (-)-Strang aus, in gegenläufiger Richtung initiiert werden, wobei der Transkriptionsstart weniger als 1000 bp auseinander liegt. Eine charakteristische Eigenschaft solcher bidirektionaler Promotoren sind die so genannten CpG-Inseln zwischen den Genen, welche gänzlich oder teilweise mit den ersten Exons überlappen [75]. Beispiele für derartige, bidirektionale Genpaare sind bereits seit längerem bekannt. Sie dienen z.B. dazu stöchiometrische Mengenverhältnisse von Proteinen, wie z.B. Histonen aufrechtzuerhalten oder sorgen für eine koordinierte, zelluläre Reaktion auf Signalinduktionen, z.B. bei Heat-Shock Proteinen [76].

Die antisense-Orientierung des Provirus bei den Integrationen in 5'-upstream Regionen, z.B. bei den Genen *txnr1*, *rhobtb3*, *copb*, und dem hypothetischen Protein FLJ12910, könnten als Hinweis auf einen bidirektionalen Promotor gedeutet werden, mit transkriptioneller Aktivierung in sense- und/oder antisense-Orientierung, in spezifischem zellulären Kontext. Alternativ dazu besteht die Möglichkeit, dass, ausgehend von dem bidirektionalen Promotor,

nicht-funktionale Transkripte (transcriptional noise) entstehen. In diesem Fall könnte das Gegenstrang-Transkript durch einen vollständigen reading frame und einem polyA-Schwanz stabilisiert werden.

4.3 Identifizierung von Überlebensgenen durch Aktivierung des TNF α -Signalweges

TNF α entfaltet ein sehr breites Spektrum biologischer Aktivitäten. Die pleiotropen Effekte sind abhängig vom Gewebetyp und dem zellulären Kontext. Darüber hinaus sind Zeitpunkt und Dauer der TNF α -Induktion ein wichtiger Faktor. Die Aktivierung des TNF-Signalweges vor allem über TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1) kann einerseits zur Rekrutierung der Initiatorcaspasen -8 und -10 und damit zur Einleitung von Apoptose führen, andererseits kann die Signalgebung über die Adaptermoleküle TRAF2 und RIP die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B einleiten. Über die transkriptionelle Induktion von anti-apoptotischen Genen durch NF- κ B aktiviert TNF α Überlebenssignale in der Zelle. Die Identifizierung derartiger, in Tumoren hochregulierter Gene, war ein Ziel dieser Arbeit.

Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine zentrale Rolle bei der Tumorentstehung spielt. Dabei sind die zellulären Reaktionen auf Aktivierung von NF- κ B sehr vielschichtig und begünstigen vielfach die Tumorentwicklung auf Ebene der Zellproliferation, Angiogenese, Motilität, Adhäsion und bei der Verhinderung von Apoptose [77]. Viele Formen von Leukämien, Lymphomen und solide Tumoren zeichnen sich durch eine konstitutive Überexpression von NF- κ B aus [78]. Dies führt vermutlich über eine Induktion von *rel/nf- κ B*-abhängigen Genen zur Karzinogenese [79]. Obwohl die genaue Rolle, die NF- κ B bei der Pathogenese von Tumoren spielt noch nicht im Detail aufgeschlüsselt ist, zeigt sich immer deutlicher, dass die Verhinderung von Apoptose ein wesentlicher Faktor ist. Es wird angenommen, dass die durch eine Überexpression von NF- κ B induzierten anti-apoptotischen Proteine zu einem selektiven Überleben von Krebszellen führen. Inzwischen konnte nachgewiesen werden, dass NF- κ B je nach Tumorart unterschiedlich wirkt. Dies wird insbesondere bei den verschiedenen Formen von Brustkrebs deutlich. Bei Östrogenrezeptor (estrogen receptor, ER)-negativen Formen, die den ErbB1- (epidermal growth factor receptor) Rezeptor überexprimieren, ist NF- κ B permanent aktiviert, nicht hingegen bei ER-positiven Tumoren [80]. Dieser Sachverhalt unterstreicht die differenzierten Effekte die NF- κ B über die Induktion unterschiedlicher Genexpressionsprofile/-programme in verschiedenen Tumorentitäten vermutlich hat. Die Berücksichtigung solcher tumorspezifischer, molekularer Diversitäten hat besondere Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Die Erkenntnis, dass die Bedeutung

NF- κ B-abhängiger Signalgebung offensichtlich in verschiedenen Tumoren bzw. Tumorunterklassen differiert bedeutet auch einen differenzierten Einfluss auf das Wachstum und die anti-apoptischen Effekte in den Krebszellen. Daher war das Ziel dieser Arbeit neue Gene zu identifizieren, die insbesondere in den NF- κ B-abhängigen, TNF α -vermittelten Signalwegen aktiviert werden. Sie könnten für neue Therapieansätze, die an verschiedenen Stellen der NF- κ B-Aktivierung ansetzen, von Bedeutung sein.

Die Identifizierung Genfallen-markierter Loci in dieser Arbeit gibt weiteren Aufschluss über die Bedeutung NF- κ B-abhängiger Signalgebung. Nach der TNF α -Stimulation von Reporterzellen, der eine kurzfristige, NF- κ B vermittelte Induktion von Überlebensgenen vorgeschaltet ist, konnten eine Reihe von Kandidatengenen identifiziert werden, die für Membrantransportproteine, Zytoskelettproteine, Zelladhäsionsmoleküle oder anti-apoptische Proteine kodieren. Darunter befinden sich einige, die bisher noch nicht mit der TNF α -Signaltransduktionskaskade assoziiert wurden und zudem in verschiedenen Tumoren überexprimiert sind.

Im Rahmen dieses Projektes konnte mit *abcc2* ein Gen identifiziert werden, das, wie das zur gleichen Familie gehörende humane *mdr1*-Gen (multidrug resistance), für ein ATP-bindendes Transportprotein kodiert und als Resistenzgen bekannt ist. *Mdr1* besitzt eine Konsensus-Bindungssequenz für NF- κ B und seine Expression wird *in vitro* durch diesen Transkriptionsfaktor gefördert [81]; ob dies auch für *abcc2* gilt, ist unklar. Das MDR1-Protein transportiert Toxine, u.a. auch pro-apoptische Zytostatika, die zur Krebstherapie eingesetzt werden, aus der Zelle heraus [82]. Da die Wirkungen zellreduktiver Zytostatika zum großen Teil auf der Induktion von Apoptose basieren, sind die meisten derzeit gebräuchlichen chemotherapeutischen Wirkstoffe auf intakte, apoptotische Signalwege in der Zelle angewiesen. Die konstitutive NF- κ B-Aktivität in vielen Tumoren schützt allerdings die Zellen vor apoptotische Stimuli. Daher überrascht es nicht, dass Resistenzen gegenüber Zytostatika ein großes klinisches Problem darstellen. Einige in der Krebstherapie eingesetzten Zytostatika (Taxane, Vinca-Alkaloide, Topoisomerase-Inhibitoren) bewirken unglücklicherweise ebenfalls eine Aktivierung von NF- κ B, was die beschriebene Chemoresistenz zur Folge haben kann. Ob derartige Resistenzen bei Tumorzellen generell auf NF- κ B zurückzuführen ist, ist derzeit noch unklar, es ist allerdings denkbar, dass eine Form der Resistenzbildung über NF- κ B und die Aktivierung detoxifizierender Transportproteine gesteuert wird. Ein besseres Verständnis der molekularen Verbindungen zwischen Zelltod und Tumorgenese könnte neue Möglichkeiten für gezielte therapeutische Ansätze liefern, mit deren Hilfe das apoptotische

Potential durch genetische oder pharmakologische Ansätze wiederhergestellt werden könnte. Möglicherweise könnte eine Inhibierung von NF- κ B, mit dem Ziel Resistenzbildungen zu unterbinden, die Effizienz einer Krebstherapie verbessern.

Von besonderem Interesse könnte auch die Identifikation von *ptp4a1* sein. Das von diesem Gen kodierte Protein gehört zu einer Familie von Tyrosin-Phosphatasen (PTP's). Kinasen und Phosphatasen steuern die reversiblen Prozesse der zellulären Phosphorylierungen und sind bei einer Reihe von Krankheiten, wie z.B. Krebs, fehlgesteuert. Das funktionale Verständnis von Kinasen und Phosphatasen im humanen Genom, insbesondere bei der Apoptose, ist derzeit noch sehr lückenhaft. Eine Ausnahme stellt die relativ gut charakterisierte Tumorsuppressor-Phosphatase ist PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) dar. Mutationen oder Deletionen im *pten*-Tumorsuppressorgen sind bei vielen menschlichen Tumoren sehr weit verbreitet [83]. Das Gen kodiert für eine Lipidphosphatase, die primär Phosphatgruppen von wichtigen, intrazellulären Signalmolekülen der Phosphoinositol-Gruppe entfernt. Dies führt zu verringertem Zellwachstum und zu einer Blockade von Überlebenssignalen, indem der Phosphoinositol-3 Kinase (PI3K) Signalweg blockiert wird [84]. Es gibt Hinweise darauf, dass diese Funktion entscheidend ist für die Fähigkeit von PTEN, die zelluläre Homeostase aufrechtzuerhalten. Das Fehlen von funktionalem PTEN in Tumorzellen führt zu einer konstitutiven Aktivierung von Komponenten des PI3K-Signalweges wie z.B. Akt und mTOR-Kinasen. Dies wiederum führt zur Phosphorylierung von Proliferations-aktivierenden und anti-apoptischen Proteinen [85].

In einer kürzlich veröffentlichten Studie, in der mit Hilfe einer siRNA-Bank neue humane Kinasen und Phosphatasen identifiziert und deren potentielle Funktionen bei der Unterstützung des zellulären Überlebens untersucht wurden, konnte 5 % der identifizierten Phosphatasen eine Tumorsuppressoraktivität zugeordnet werden [86]. Ein Beispiel dafür ist die Rezeptor-ähnliche Tyrosin-Phosphatase (PTPRJ), die normalerweise den PDGF (platelet derived growth factor)-Rezeptor inaktiviert und häufig Mutationen bei Kolonkarzinomen aufweist [87]. Zudem konnten zwei zusätzliche Rezeptor-ähnliche PTPs identifiziert werden, welche Zelltod fördern und somit möglicherweise ebenfalls neue Tumorsuppressoren repräsentieren. Bei einer Herunterregulation dieser Phosphatasen kam es zu einer ausgeprägten zellulären Resistenz gegenüber Wirkstoff-induziertem Zelltod, was einhergeht mit der Hochregulation von Überlebenssignalen in diesen Zellen. Auffällig war dabei, dass viele der Gene, die für diese Phosphatasen kodieren, entweder in verschiedenen Krebszelllinien mutiert sind oder aber in chromosomalen Regionen angesiedelt sind, die für

häufige Mutationen bekannt sind (mutational hotspots). Ein Beispiel hierfür ist die Phosphatase PPP1R7, die bei diversen Cervixkarzinomzelllinien herunterreguliert und in vielen weiteren Tumorzelllinien mutiert ist [88].

Überraschenderweise ergab die genannte Studie aber auch, dass einer auffällig großen Zahl an Phosphatasen (72 von 222) eine zelluläre Überlebensfunktion zugeordnet werden konnte, die vorher nicht bekannt war. Diese Erkenntnisse stehen im Gegensatz zu der traditionellen Ansicht, dass Phosphatasen die Signalgebung eher terminieren oder abschwächen. Ganz im Gegenteil scheinen eine große Anzahl der untersuchten Phosphatasen und deren assoziierte, regulatorische Proteine offensichtlich potente Mediatoren bei der Förderung des Überlebens von Zellen zu sein und stellen somit möglicherweise neue, geeignete Ziele für Wirkstoffe dar. Zu der in diesem Projekt getrappten Phosphatase *ptp4a1* ist derzeit nur wenig bekannt. Allerdings gibt es einige interessante Hinweise auf anti-apoptotische Aktivitäten. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von *ptp4a1* durch Egr-1, einem durch Wachstumsfaktoren aktivierten Transkriptionsfaktor, reguliert wird [89]. Die Überexpression von PTP4A1 in Epithelzellen führte zur Zelltransformation, darüber hinaus waren die transformierten Zellen in der Lage Tumoren in Mäusen zu entwickeln [90]. Die Ergebnisse zeigen, dass *ptp4a1* möglicherweise bei der Regulation der Zellproliferation fungiert und zur Tumorgenese beiträgt. Die durch diese Arbeit nachgewiesene Verbindung zur TNF α -Signalkaskade bzw. zu NF- κ B könnte neue Hinweise für eine präzisere, funktionale Charakterisierung liefern. Die Aufklärung der Mechanismen, über die PTP4A1 spezifische Protein-Phosphorylierungszyklen reguliert und über ihre Substrate, könnte einen wichtigen Beitrag zum Verständnis onkogener Signalgebung liefern.

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente führten zur Identifizierung einer Reihe viel versprechender Kandidatengene für eine weitergehende, funktionale Validierung im Hinblick auf potentielle Eigenschaften als Überlebensgene. Zudem offenbart der hohe Anteil an Genfallen-Integrationen in nicht-kodierende Regionen, dass Genfallen ein nützliches Werkzeug bei der Suche nach nicht-kodierenden RNAs in lebenden Zellen sein können. Ihr Einsatz könnte möglicherweise die Methode der Wahl für die Identifizierung derartiger Transkripte darstellen.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Vektoren und Konstrukte

pBABELxpuroIxbetageo (Doppelselektionsvektor)

pBABEPGKCre (Cre-Expressionsplasmid)

pBABECrelox (U3Cre-Genfalle)

pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA)

Helferplasmide zur Virusherstellung:

pVPack-GP: Expressionsvektor für das retrovirale Capsidprotein Gag (group specific antigen) und die reverse Transkriptase Pol.

pMDG: Expressionsvektor für das *Vesicular Stomatitis Virus* G-protein (VSV-G); dieses Hüllprotein erkennt keinen Proteinrezeptor auf der Oberfläche der Wirtszellen, sondern interagiert mit Membranlipiden, die sich auf allen Vertebratenzellen befinden. Ein Retrovirus mit diesem Hüllprotein kann daher alle Vertebratenzellen infizieren (pantroper Retrovirus).

5.1.2 Synthetische Oligonukleotide

DNA-Oligonukleotide wurden von den Firmen Interactiva Biotechnologie GmbH (Ulm) und Carl Roth (Karlsruhe) bezogen; es wurden folgende Oligonukleotide eingesetzt:

<i>mpgkfor2</i>	5' TGGCCTCGCACACATTCCACAT 3'
<i>mpgkfor1</i>	5' CGGCATTCTGCACGCTTCAA 3'
<i>puroNTrev</i>	5' CCGTGGGCTTGTA CTCCGGTCA 3'
<i>geoB</i>	5' CAGCAGCAGACCATTTTCAA 3'
<i>cre1p</i>	5' GCATGCTAGCTTGCCAAACC 3'
<i>cre43</i>	5' CGGTCAGTAAATTGGACACCTTCC 3'
<i>sy1</i>	5' ACCCGTGGTGGAACTGACG 3'
<i>sy2</i>	5' GCTAACTAGCTCTGTATCTGGCGGAC 3'
<i>univ(-47)</i>	5' CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC 3'
<i>rev(-48)</i>	5' AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA 3'
<i>cav for1</i>	5' TCCTCACAGTTTTTCATCCAGCCAC 3'

<i>cav rev1</i>	5' TGGAACCTTGAAATTGGCACCAGG 3'
<i>atf for1</i>	5' ACAAGAGTACCACGTCAGAGACAG 3'
<i>atf rev1</i>	5' TCCTCTGTCACTAGATATCGTGCG 3'
<i>cbx4 for1</i>	5' AAGGGCAGAGTGGAGTATCTGGTG 3'
<i>cbx4 rev1</i>	5' TTCATCTTGCCCCCAATCCCGTTG 3'
<i>prl for1</i>	5' TCACTGCATGGTAGAGTCTGGTG 3'
<i>prl rev1</i>	5' ATGCTAGGGCAACAAGTACTGGAG 3'

5.1.3 Bakterienstämme

Für die Propagation von Plasmiden wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α mit folgendem Genotyp verwendet: F'*endA1 hsdR17*(r_k⁻m_k⁺) *glnV44 thi-1recA1 gyrA* (Nal^r) *relA1* Δ (*lacZYA-argF*)*U169 deoR*(Φ 80*dlacA*(*lacZ*)*M15*). Dieser spezielle Wirtsstamm muss wegen der LacZ-Mutation für das blau-weiss Screening benutzt werden und ist für alle anderen Routinarbeiten mit rekombinanten Plasmiden geeignet.

5.1.4 Biochemikalien und Kits

[α -³²P]dCTP (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)

Ampicillin (Sigma, St Louis)

Desoxynukleotid-Triphosphate, 100 mM (Invitrogen, Carlsbad CA, USA)

DNA-Größenstandard, 1 kb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

DNA-Größenstandard, 100 bp (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden)

G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)

Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden)

Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden)

Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Puromycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden)

QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)

Rediprime Random Primer Labeling Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)

RNA-Größenstandard (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

RNeasy Maxi Kit (Qiagen, Hilden)

Trypsin (Sigma, St Louis)

5.1.5 Chemikalien

Alle übrigen Chemikalien wurden von den Firmen Amersham Biosciences Europe GmbH, (Freiburg), Boehringer Mannheim (Mannheim), Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz), Gibco/BRL (Karlsruhe), Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München) oder Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

5.1.6 Verbrauchsmaterial

Einmalpipetten (Greiner Bio-One International AG, Frickenhausen)
Filtrationsmembran Biomax-100 (Millipore Co., Billerica, MA, USA)
FuGENE 6 Transfektionsreagenz (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz)
Hybridisierungslösung (Ambion, Austin, Tx, USA)
Nylonmembran (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)
Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg)
RNA-Ladepuffer 6 x (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)
Röntgenfilme Biomax MS-1 (Kodak, Rochster, NY, USA)
Ultrafiltrationseinheit Centricon Plus20 (Millipore Co., Billerica, MA, USA)
Zellkulturschalen (Greiner Bio-One International AG, Frickenhausen)

5.1.7 Enzyme und enzymatische Reaktionssysteme

Taq DNA-Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
Platinum *Taq* DNA-Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
T4 DNA-Ligase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)
Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Beverly, MA, USA)

5.1.8 Geräte

DNA Sequencer ABI Prism 310 automated sequencer (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)
Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)
Autoklav (Varioklav (H & P Labortechnik, Oberschleißheim)
Brutschrank Typ B 6030 (Heraeus, München)
Bodenzentrifuge Rotina 35 (Hettich, Tuttlingen)
Elektrophoresekammern (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
Filmentwicklermaschine (Kodak, Rochester, NY, USA)
Fluorometer (Tecan Trading AG, Zürich, Schweiz)

Gefrierschrank UF85 300S (Colora, Lorch)
Hybridisierungsöfen (Biometra, Göttingen)
Kühlschrank (Liebherr, Biberach)
Kühlzentrifuge (Heraeus, München)
Magnetrührer (IKA-GmbH, Staufen)
Mikroskop (Leica, Benzheim)
Mikrowellenherd (Bosch, Stuttgart)
Milli-Q-Reinstwasser-Anlage (Millipore, Eschborn)
Phosphorimager (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J, USA)
pH-Meter Mikroprozessor pH 210 (Hanna Instruments, Bedfordshire, U.K.)
Pipetten (Gilson, Middleton, Wi, USA)
Schüttelinkubator Certomat U (B. Braun)
Spektralphotometer GeneQuant RNA/DNA calculator (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J, USA)
Sicherheitswerkbank (Heraeus, München)
Thermo-Cycler (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg)
Transilluminator (Bachofer, Waiblingen)
Vortexer (Neo-Lab, Heidelberg)

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Arbeitsvorbereitungen

Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die verwendeten Materialien und Geräte wurden mit 70 % Ethanol gereinigt. Alle verwendeten Lösungen wurden sterilfiltriert, sofern sie nicht vom Hersteller steril geliefert wurden.

5.2.2 Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung

Die Zellen wurden in Begasungsbrutschränken bei 5% CO₂ und 37 °C kultiviert. Es wurden nur adhärent wachsende Zelllinien verwendet, die vor Erreichen der Konfluenz auf den Kulturschalen umgesetzt wurden. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS-Puffer gewaschen und mit wenig Trypsin-Lösung (Gibco, Kat: 15090-046, 1 x in PBS)

überschichtet. Nach etwa 2 min bei 37 °C wurde der proteolytische Verdau durch Zugabe von Medium gestoppt, die sich ablösenden Zellen vorsichtig vollständig resuspendiert und mit weiterem Medium verdünnt erneut auf Kulturschalen ausgesät. Der Verdünnungsfaktor ist abhängig vom Zelltyp und lag zwischen 1:3 und 1:10. Nach jeweils zwei Tagen wurde unabhängig von der Zelldichte bei allen Zellen das Medium erneuert.

HeLa-Zellen (ATCC Nr. CCL2)

Eine humane Cervix-Karzinomzelllinie. Die Zellen sind nicht transformiert, wachsen kontakthinhibiert und können permanent kultiviert werden, da sie immortalisiert sind. Die Zellen wurden als Monolayer in Zellkulturschalen in RPMI 1640 Medium (Gibco Kat: 21875-024) und weiteren Supplementen kultiviert (90 % RPMI 1640, 10 % (v:v) fötales Kälberserum, Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml. Das Medium enthält bereits 2 mM L-Glutamin. Das fötale Kälberserum (Biochrom Kat. Nr. S0155) wurde vor der Zugabe zum Medium durch Erhitzen bei 56 °C für 45 min inaktiviert.

HEK 293T-Zellen (ATCC Nr. CRL-1573)

Die Zellen basieren auf einer humanen, embryonalen Nierenzelllinie (Pear et al., 1993). Diese Zelllinie wurde durch Einbringen von gescherter Adenovirus-DNA in embryonale Zellen hergestellt (Graham et al., 1997). Die Zelllinie 293T ist ein Subklon, der zusätzlich das SV40 (simian virus 40) T-Antigen exprimiert. Die Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL) kultiviert (90 % DMEM, 10 % fötales Kälberserum, Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml.

5.2.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Das Auftauen von Säugerzellen aus der Kryokonservierung erfolgte durch Erwärmung im Wasserbad (37 °C). Unmittelbar danach wurden die Zellen in ein 15 ml Greiner-Röhrchen mit Kulturmedium zur Verdünnung des im Einfriermedium enthaltenen DMSO überführt und bei 2000 rpm für 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Einfriermedium mit dem toxischen DMSO abgesaugt, die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und gleichmäßig auf die Kulturschale verteilt, bevor sie dann im Inkubator kultiviert wurden.

Zum Einfrieren wurden die Zellen aus einer subkonfluenten Kulturschale (9 cm) abgelöst, in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und wie oben zentrifugiert. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen in etwa 1 ml Einfriermedium (90 % fötales Kälberserum, 10 % DMSO) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann in ein Kryoröhrchen überführt und

über Nacht in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox (Nalgene) bei -80 °C langsam abgekühlt, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert wurde.

5.2.4 Zellzahlbestimmung

Um Zellzahlen zu ermitteln wurde ein Standard Hämozytometer (Neubauer Zählkammer) verwendet. Das Volumen des mit einem Deckglas nach oben begrenzten Großquadrats beträgt $0,1\text{ mm}^3$, so dass sich die Zellkonzentration (Zellen/ml) nach folgender Formel bestimmen lässt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Zählwert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4.$$

Die Zählkammer wurde angefeuchtet und mit einem Deckglas versehen. Das Erscheinen von sogenannten Newtonringen zeigte an, dass das Deckglas richtig angebracht war. Mit einer Glaspipette konnte dann ein Tropfen aus der Zellsuspension in die Kammer gefüllt und unter dem Mikroskop ausgezählt werden.

5.2.5 Bestimmen der metabolischen Aktivität

In erster Näherung kann die metabolische Aktivität kultivierter Zellen als Maß für die Lebendzellzahl herangezogen werden. Zur Messung der metabolischen Aktivität wurde der XTT-Test der Firma Roche verwendet. Das Prinzip dieses Testsystems beruht auf der Metabolisierung von gelben Tetrazoliumsalzen (XTT) zu orangen, löslichen Formazan-Produkten. Da das Reaktionsprodukt im Gegensatz zum Edukt ein anderes Absorptionsmaximum besitzt, lässt sich die Formazanbildung photometrisch quantifizieren.

Der Ablauf des Experiments orientierte sich, bis auf wenige Modifikationen, an den Vorgaben des Herstellers. Die Messungen erfolgten auf 24-Loch Platten, auf denen pro Versuchsansatz 3×10^4 Zellen in $300\text{ }\mu\text{l}$ Medium ausgesät wurden. Die XTT-Lösung wurde unmittelbar vor Gebrauch aus Färbereagenz und Elektronenbindungsreagenz im Verhältnis 50:1 gemischt und auf 37 °C vorgewärmt. Nach Entfernen des Mediums und Waschen der Zellen wurden jeweils $150\text{ }\mu\text{l}$ aus dieser Lösung, zusammen mit $300\text{ }\mu\text{l}$ Medium, auf die Zellen appliziert und 16 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend konnten die Platten im Fluorometer spektralphotometrisch gemessen werden, wobei die Extinktion bei einer Wellenlänge von 490 nm ermittelt wurde, bei der das Formazan die höchste Absorption besitzt. Die Extinktionen sollten in einem Bereich von 0.5 bis 2.0 liegen, um die Genauigkeit der Messungen zu gewährleisten.

5.2.6 Colorimetrischer Nachweis von intrazellulärer, bakterieller β -Galaktosidase in Säugerzellen

Bei Studien zur Untersuchung der Genregulation hat sich das bakterielle β -Galaktosidase Gen (LacZ) als Reporter bewährt. Die LacZ-Expression wurde in der vorliegenden Arbeit *in vitro* in den HeLa-Reporterklonen untersucht. β -Gal (β -D-Galactosid-Galakto-Hydrolase) ist ein Homotetramer aus Untereinheiten von je 1021 Aminosäuren und spaltet β -D-Galaktoside in Galaktose und die entsprechende Alkohol-Verbindung. Das physiologisch wichtigste Substrat ist Laktose. Ein unphysiologisches Substrat für das Enzym ist das 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal), dessen Hydrolyseprodukt zu einem blauen, schwer löslichen Indigofarbstoff oxidiert, der nicht aus den Zellen herausdiffundieren kann. Die Zellen die das Enzym exprimieren werden daher blau gefärbt.

Zur Anfärbung wurden die Zellen zweimal in PBS-Puffer gewaschen, mit Fixierlösung bedeckt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem vorsichtigem Waschen in PBS wurde die X-Gal Färbelösung zu den Zellen gegeben und diese bei 37 °C inkubiert, bis eine deutliche Blaufärbung sichtbar wurde. Danach wurde die Färbelösung abgenommen und durch PBS ersetzt.

Fixierlösung: 0,75 % Formaldehyd, 0,05 % Glutardialdehyd, in PBS

LacZ Färbepuffer: 10 mM K-ferrocyanid ($K_4(FeCN)_6 \cdot 3H_2O$), 10mM K-ferricyanid ($K_3(FeCN)_6$), 2mM $MgCl_2$. Die Salze wurden in PBS gelöst und bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

LacZ Färbelösung: X-Gal Stammlösung (1 mg/ml Dimethylformamid) 1:40 in LacZ Färbepuffer verdünnt. Die LacZ Färbelösung wurde unmittelbar vor dem Experiment frisch vorbereitet.

5.3 Retroviraler Gentransfer

5.3.1 Arbeiten mit rekombinanten Retroviren

Es wurde ausschließlich mit rekombinanten *Moloney Murine Leukemia Viruses (MLV)* unter S2-Bedingungen gearbeitet. Die *MLV* sind RNA-Viren, gehören zur Familie der *Retroviridae*

und zur Gattung der *Murinen Leukämie Viren*. Bei Gentransfersystemen auf retroviraler Basis muss gewährleistet sein, dass das rekombinante Retrovirus, welches als Genfahre dient, frei von replikationskompetentem Wildtyp-Virus ist (Valerio, 1992). Um diesem Sicherheitsaspekt gerecht zu werden macht man sich die Tatsache zu nutze, dass bei der Bildung vollständiger retroviraler Partikel die zu verpackende retrovirale RNA ein *trans*-Element sein kann. Die Verpackungszelllinie wurde neben dem Konstrukt, das für die zu verpackende RNA kodiert mit zwei Helferplasmiden kotransfiziert, welche die benötigten viralen Proteine Gag, Pol und Env kodieren. Da die entsprechenden RNAs kein Verpackungssignal besitzen, können sie nicht in die Viruspartikel verpackt werden; deswegen können die infizierten Zielzellen keine Viruspartikel produzieren. Die verwendete Verpackungszelllinie basiert auf einer menschlichen Zelllinie, so dass keine Gefahr besteht, dass die auf einem Maus-Retrovirus basierten Konstrukte mit endogenen murinen Retroviren rekombinieren können und dadurch evtl. replikationskompetente Viren entstehen könnten. Zudem ist das eingesetzte Retroviruskonstrukt ein SIN-Typ (self inactivating) Vektor, da sich in dem LTR des Provirus keinerlei transkriptionsregulatorische Sequenzen (Promotor, Enhancer) mehr befinden. Dies ermöglicht die unbeeinflusste Expression des Transgens durch einen internen Promotor.

5.3.2 Herstellung von VSV-G pseudotypisierten *MLV* -Retroviren

Um infektiöse Viruspartikel zu erzeugen wurden 293T Zellen mit den gewünschten Plasmidkonstrukten und entsprechenden Helferplasmiden kotransfiziert. Zur transienten Transfektion wurde das Transfektionsreagenz "FuGENE 6" (Roche) verwendet und nach der Anleitung des Herstellers verfahren. Die zu transfizierende Verpackungszelllinie wurde am Vortag in einer Dichte von 4×10^6 Zellen auf eine 9 cm Schale ausplattiert. Am Tag der Transfektion waren die Platten zu etwa 70 % konfluent. Es wurden für jede zu transfizierende Schale 800 μ l frisches DMEM-Medium (ohne Serum) und 25,2 μ l "FuGENE 6" in einem sterilen Eppendorf-Gefäß vorgelegt und für 5 min bei RT belassen. Die DNA der zu transfizierenden Plasmide wurde in einem separaten Gefäß gemischt. Hierzu wurden 3,3 μ g des Plasmids von dem die zu verpackende RNA transkribiert wird (siehe Vektoren und Konstrukte), 16,5 μ g des ersten Helferplasmides (pVPack-GP) und 1,2 μ g des zweiten Helferplasmides (pMDG) zusammenpipettiert. Anschließend wurde das FuGENE 6/Medium-Gemisch langsam zu der DNA getropft, vorsichtig vermischt und 15 min bei RT inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte ein Mediumwechsel bei den zu transfizierenden Zellen. Im nächsten Schritt wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen geträufelt. Die Zellen wurden

dann für 24 h unter Kulturbedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Virusüberstand abgenommen, durch 10 ml neues Medium ersetzt und über Nacht im Brutschrank inkubiert, bevor erneut der Virusüberstand abgenommen und mit dem vorher gewonnenen vereinigt wurde. Die gesammelte Virussuspension wurde anschließend durch einen Filter mit einem Porendurchmesser von 0,45 μm filtriert, um evtl. vorhandene Verpackungszellen zu entfernen. Der virushaltige Zellkulturüberstand wurde bei - 80 °C gelagert.

5.3.3 Konzentrierung von VSV-G pseudotypisierten *MLV*–Retroviren

Die Virusüberstände wurden mit Hilfe einer Centricon Plus 20 Ultrafiltrationseinheit mit einer Biomax-100 Filtrationsmembran (Molekulargewichtsgrenze 100000 kDa), nach Herstellerangaben, konzentriert. Dazu wurden 19 ml Virusüberstand eingefüllt und in einer Bodenzentrifuge 30 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Das Filtrat aus dem Sammelröhrchen wurde verworfen. Die Filtersäule in der Konzentrierungskammer wurde invertiert und für 1 min bei 500 rpm und RT zentrifugiert, um etwa 100-fach konzentrierten Virus zu erhalten. Alle Konzentrate wurden zusammengemischt, in 1 ml Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80 °C gelagert.

5.3.4 Infektion von Wirtszellen mit retroviralen Partikeln

5×10^6 Wirtszellen wurden auf 9 cm Kulturschalen ausgesät und am nächsten Tag mit 3 ml Virusüberstand, welcher zuvor mit Polybren in einer Endkonzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ supplementiert wurde, infiziert. Nach 5 h Inkubation im Brutschrank wurde 6 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben, um sie anschließend über Nacht im Brutschrank zu kultivieren. Am nächsten Tag wurde das virushaltige Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen.

5.3.5 Herstellung von HeLa-Reporterklonen

Zur Transduktion von HeLa-Zellen mit dem Reporterkonstrukt wurden vier 9 cm Kulturschalen mit jeweils 5×10^6 HeLa WT-Zellen ausgesät und am nächsten Tag mit den Viruspartikeln infiziert. Zur Titration wurde der Virus in vier seriellen Verdünnungen, von 1:10 bis 1:10000, bei einem Volumen von 3 ml Virusüberstand pro Schale appliziert. Nach 5 h Inkubation im Brutschrank wurde 6 ml frisches Medium auf die Zellen gegeben, um sie anschließend über Nacht im Brutschrank zu kultivieren. Am nächsten Tag wurden zunächst die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend wurde mit der Puromycin-Selektion (1 $\mu\text{g/ml}$) begonnen. Jede Integration sollte wegen des konstitutiv aktiven Promotors zu einem

Puromycin-resistenten Zellklon führen. Das Selektionsmedium musste alle 2 Tage ausgetauscht werden. Anhand der Zahl der infizierten Zellen und der Klone auf der Platte konnte eine MOI bestimmt werden (siehe Ergebnisteil). Direkt von der Platte mit der stärksten Verdünnung wurden nach drei Wochen 10 Klone isoliert und in eine 24-Loch Platte transferiert, wo sie weiter unter Selektionsdruck expandiert wurden.

5.3.6 Infektion von HeLa260 mit Cre-Expressionsvirus

Die Infektion von HeLa260 mit einem Cre-Expressionsvirus diente zur Überprüfung der Eigenschaften des Reporterklons. Dabei kommt es in den infizierten Zellen zu einer Cre-induzierten Rekombination, worauf mit G418 selektiert wurde. Um eine möglichst hohe Transduktionsrate zu erreichen, wurden wenige Zellen mit konzentriertem Virus infiziert. Daher wurden von jedem Klon 2×10^4 Zellen, in einer 12-Loch Schale ausgesät und am nächsten Tag 200 μ l einer konzentrierten Virussuspension zu den Zellen gegeben. Der Infektionsansatz verblieb für etwa 4 h im Brutschrank, anschließend wurde 400 μ l RPMI-Medium zu den Zellen gegeben, wobei das virushaltige Medium vorher nicht abgenommen wurde. Nach weiteren 4 h wurde erneut die gleiche Menge frisches Medium dazupipettiert. Am nächsten Tag wurde der Virusüberstand entfernt und durch normales Medium ersetzt. Am darauf folgenden Tag wurde mit der G418-Selektion begonnen (1 mg/ml). Die Zellen wurden für etwa drei Wochen unter Selektionsdruck gehalten und zwischenzeitlich immer wieder gesplittet.

5.3.7 Titration der Genfalle auf HeLa260 und Herstellung der Integrationsbank

Für die Titration der U3Cre-Genfalle auf HeLa260 wurde wiederum eine serielle Verdünnungsreihe (siehe oben) gemacht. Dazu wurden 10^5 HeLa260 Zellen in 6 cm Schalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden die verdünnten Retrovirusüberstände zu den Zellen gegeben. Jeweils 3 ml Virussuspension wurden dazu auf die Schalen gegeben. Nach 4 h Inkubation im Brutschrank wurden noch mal 3 ml frisches Zellkulturmedium zusätzlich auf die Zellen pipettiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen trypsinisiert und auf 9 cm Schalen ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurde das virushaltige Medium durch G418-Selektionsmedium (1 mg/ml) ausgetauscht und jeden zweiten Tag gewechselt, bis nach 8 Tagen alle nicht-transduzierten Zellen eliminiert waren und die transduzierten Zellen ca. 1-3 mm große Kolonien bildeten. Diese wurden durch eine Kristallviolett-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 2 ml der Färbelösung (1% Kristallviolett in PBS) zugegeben und nur kurz bei Raumtemperatur gefärbt. Danach wurde

die Färbelösung vorsichtig unter fließendem Wasser abgegossen und die Zellen getrocknet, bevor die dunkel-violett gefärbten Zellkolonien gezählt wurden. Zur Bestimmung des Retrovirustiters wurden nur die Verdünnungsstufen ausgewertet, bei denen zwischen 5 und 300 Kolonien gezählt wurden. Da das *cre*-Gen keinen eigenen Promotor besitzt, kommt es nur bei einer Insertion in aktive Gene zur Rekombination im Reportersystem und anschließenden G418-Resistenz. Daher spiegelt die Zahl der G418-resistenten Klone nicht den echten Virustiter wider, sondern den sogenannten "Genfallentiter". Erfahrungsgemäß liegt der reale Titer 100-200 x höher. Basierend auf dem so abgeschätzten Titer wurden 10^7 HeLa260 Zellen mit einer MOI von 0,5 infiziert. Dazu wurden fünf 15 cm Schalen mit jeweils 2×10^6 Zellen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit 1×10^6 Viruspartikeln pro Schale. Bei Aktivierung der Genfalle kommt es zur Rekombination im Reportersystem und die Zellen verlieren die Puromycinresistenz. Dies wurde genutzt, um alle Zellen mit Genfallen-Integrationen in konstitutiv aktive Loci zu eliminieren, wozu bereits am darauf folgenden Tag mit der Puromycin-Selektion ($1 \mu\text{g/ml}$) begonnen wurde. Da nicht jede Zelle mit der Genfalle infiziert wurde, überleben während dieses ersten Selektionsschrittes mit Puromycin auch alle nicht-infizierten Zellen, weil es in ihnen nicht zu einer Rekombination im Reportersystem kommt. Um zu erreichen, dass in der Gesamtpopulation alle Virusintegrationen in der Genfallenbank gleichmäßig repräsentiert blieben, wurden die Zellen vor Erreichen der Konfluenz mehrfach umgesetzt und dabei jeweils wiederum in der Ausgangsdichte (1×10^7 Zellen, verteilt auf fünf 15 cm Schalen) ausplattiert. Die Puromycin-Selektion wurde zehn Tage durchgeführt, bis keine toten Zellen mehr beobachtet werden konnten.

Als nächstes erfolgte die TNF α -Induktion der überlebenden Zellen. Dazu wurden 5 Schalen (15 cm) mit jeweils $2,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät. Es wurden zwei Behandlungszeiträume von 8 h und 24 h gewählt. Zusätzlich diente eine Schale als Kontrolle für die Effizienz der G418-Selektion und auf das spontane Auftreten resistenter Zellklone. Die TNF α -Konzentration betrug 50 ng/ml. Durch die unmittelbar anschließende Zugabe von G418 (1 mg/ml) auf die Zellen, wurde mit der Selektion für Zellen mit Integrationen in TNF α induzierte Gene begonnen. Die Zellen mit Genfallen-Integrationen in andere Loci starben dabei, genauso wie alle nicht-infizierten Zellen. Die Kontrollzellen wurden nicht mit TNF α behandelt, aber dem gleichen Selektionsdruck ausgesetzt. In diesem Fall konnte keine Klonbildung festgestellt werden.

5.4 Herstellung und Analyse rekombinanter DNA

Die grundlegenden molekulargenetischen Methoden wurden entsprechend Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Alle unsterilen Geräte und Gebrauchsmaterialien wurden vor Benutzung autoklaviert, nicht autoklavierbare Lösungen sterilfiltriert.

5.4.1 Isolierung chromosomaler DNA aus Säugerzelllinien

Alle Präparationen von DNA aus Säugerzellen wurden mit dem "DNeasy Tissue Kit" von QIAGEN durchgeführt. Ausgangsmaterial waren Zellkulturplatten mit konfluenten Zellen, welche vor der Präparation 2-3 Mal mit PBS gewaschen wurden, um das Serum vollständig zu entfernen. Bei Schalen mit den Durchmessern 6 bzw. 9 cm wurden die Zellen mit Hilfe eines Plastik-Schabers abgelöst, bei kleineren Schalen wurden die Zellen abtrypsiniert. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und für 5 min bei 2000 rpm sedimentiert. Der weitere Ablauf der Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers, wobei die eingesetzten Puffervolumina bei der Verwendung von 9 cm Schalen verdoppelt und die Lysate auf zwei Säulen verteilt wurden.

5.4.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Plasmidisolierung aus 2 ml Bakterienflüssigkulturen wurde das "QIAprep spin miniprep-Kit" von QIAGEN nach den Vorschriften des Herstellers verwendet. Die Reinheit der gewonnenen DNA war für enzymatische Manipulationen und DNA-Sequenzierungen ausreichend. Es konnten etwa 20 µg Plasmid-DNA isoliert werden. DNA-Präparationen mit größerer Reinheit und Ausbeute wurden aus 100 ml LB-Flüssigkulturen mit dem "Plasmid Midi Kit" desselben Herstellers durchgeführt. Dabei wurden ca. 100 µg Plasmid-DNA isoliert.

5.4.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch Messen der Absorptionen bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm am Photometer vorgenommen. Die Messung erfolgte zumeist an 1:70 verdünnten DNA-Lösungen in 0,5 ml Quarzküvetten (Hellma, Schichtdicke 10 mm). Für doppelsträngige DNA gilt, dass eine Absorption von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Damit lässt sich unter Berücksichtigung dieser

Konstante und des Verdünnungsfaktors für jede Probe die DNA-Konzentration errechnen. Die gemessenen Werte bei Wellenlängen von 260/280 nm geben Aufschluss über Verunreinigungen. Der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} sollte bei etwa 1,8 liegen, niedrigere Werte weisen auf Protein-, höhere auf RNA/Ethanol-Verunreinigungen hin.

5.4.4 Restriktionsspaltungen von DNA

Pufferbedingungen und Inkubationstemperaturen für Restriktionsverdauungen wurden nach Herstellerangaben (New England Biolabs) gewählt. Die Inkubationszeiten orientierten sich an den eingesetzten DNA- und Enzymmengen.

5.4.5 Agarose-Gelelektrophoresen

Für die Größenanalyse und zur Rückgewinnung von DNA-Fragmenten wurde Agarose in gewünschtem Prozentsatz in 1 x TAE-Puffer resuspendiert und im Mikrowellenherd aufgeköcht. Nachdem die Agarose auf ca. 60 °C abgekühlt war, wurde Ethidiumbromid (1 µg/ml Endkonzentration) zugegeben und in die Apparatur eingefüllt, sowie die entsprechende Taschenschablone eingesteckt. Nach Aushärten der Agarose wurde die DNA mit Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde mit einer Spannung von 8 V/cm Gellänge durchgeführt.

50 x TAE-Puffer: 2M Tris-Acetat, 50mM EDTA, mit Eisessig auf pH 8 einstellen

6 x Ladepuffer: 30 % (w/v) Glycerin, 0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM EDTA pH 8

5.4.6 Reinigung und Konzentrierung von DNA (Ethanol-Fällung)

Zur Ethanol-Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen wurden 0.1 Volumenteile 3 M NaAc und 2.5 Volumenteile 96 % Ethanol zugegeben und 30 min bei - 70 °C gekühlt. Die DNA wurde durch dreißigminütige Zentrifugation bei 12000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert, je einmal mit 70 % und 96 % Ethanol gewaschen und in TE-Puffer resuspendiert.

TE-Puffer: 10 mM Tris.HCl, pH 8,1 mM EDTA

5.4.7 Präparation von DNA-Fragmenten durch Elution aus Agarose-Gelen

Um einzelne DNA-Fragmente zu isolieren bzw. zu reinigen, wurden die Nukleinsäuren in

einem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt und die DNA-Banden auf dem UV-Leuchttisch mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem Agarose-Gelstück erfolgte mit Hilfe des "QIAquick Gel Extraction Kit" (QIAGEN), nach den Angaben des Herstellers.

5.4.8 Reinigung von DNA nach enzymatischen Manipulationen

Zur Aufreinigung von PCR-Reaktionsprodukten und Restriktionsverdau wurde das "QIAquick PCR Purification Kit" von QIAGEN eingesetzt. Die Reinigung folgte ebenfalls den Angaben des Herstellers.

5.4.9 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*

Die Herstellung chemokompetenter Bakterien und deren Transformation erfolgten wie von Hanahan (1985) beschrieben.

Alle benutzten Lösungen waren auf 4 °C vorgekühlt. Eine 2 ml LB-Flüssigkultur von einem Einzelklon *E. coli* DH5 α wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Am nächsten Tag wurden 50 ml Flüssigmedium mit dieser Kultur angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Am darauf folgenden Tag wurde eine 1,5 l LB-Flüssigkultur angeimpft und solange bei 37 °C kultiviert, bis die bei 600 nm messbare Lichtstreuung 0,4-0,6 OD betrug. Anschließend wurden die Zellen in einer Sorvall-Kühlzentrifuge im GSA-Rotor bei 4000 rpm und 4 °C für 15 min sedimentiert. Bei allen nachfolgenden Schritten wurde auf Eis gearbeitet. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 50 ml TFB-I Puffer resuspendiert und 1,5 h auf Eis belassen. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension in 40 ml TFB-II Puffer wurden 200 μ l Aliquots hergestellt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei - 80 °C.

LB-Flüssigmedium: 10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl

LB-Agar: 10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar, aufkochen, auf 60 °C abkühlen lassen und in 9 cm Petrischalen gießen.

TFB-I Puffer: 15 % (v:v) Glycerin, 30 mM Kaliumacetat, 0,1 M RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂; MnCl₂ und CaCl₂: 2M Stammlösungen ansetzen (steril) und erst nach dem Autoklavieren der Lösung zugeben

TFB-II Puffer: 15 % (v:v) Glycerin, 10 mM Na-MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, Lösung mit konzentrierter NaOH auf pH 7 einstellen, autoklavieren.

5.4.10 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

200 µl kompetente *E.coli* wurden auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA (gereinigtes Plasmid oder Ligationsreaktion) in einem Eppendorf-Gefäß vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 90 sec auf 42 °C erwärmt (heat shock), 900 µl SOC-Medium (Gibco) zugegeben und 30 min (Ampicillinresistenz) bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4000 rpm für 5 min und Resuspension in einem kleinen Volumen LB-Medium konzentriert, auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100 µg/ml, bei Bedarf noch zusätzlich 20 µl X-gal (20 µg/µl), 60 µl IPTG 100 mM) ausgestrichen und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Um Bakterienkolonien mit rekombinanten Plasmiden zu identifizieren wurde eine sogenannte "blau-weiß Selektion" angewandt. Diese Methode beruht auf einer Unterbrechung des LacZ-Gens auf einem Plasmid, welches für das N-terminale α-Fragment der β-Galaktosidase, das alleine keine β-Galaktosidase-Aktivität besitzt, kodiert. Zusammen mit dem ebenfalls inaktiven, vom Wirtschromosom kodierten C-terminalen ω-Fragment, ergibt sich ein aktives Enzym (α-Komplementation). Bakterienkolonien in denen der Plasmid-kodierte Anteil des LacZ-Gens durch die Insertion eines DNA-Fragments unterbrochen ist, bleiben nach der Inkubation mit IPTG und X-Gal weiß, da keine aktive β-Galaktosidase gebildet werden kann, die in der Lage wäre, das chromogene Substrat X-Gal zu spalten. Plasmide ohne Insertion exprimieren das intakte α-Fragment und erhalten durch das Indigoprodukt der X-Gal Hydrolyse ihre blaue Farbe.

5.4.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die *in vitro* Amplifikation von DNA durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgte in den im Labor befindlichen Thermocyclern. Das Reaktionsvolumen betrug bei allen PCRs 50 µl. Folgende Komponenten wurden dazu in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß, auf Eis, zusammenpipettiert: 5 µl 10 x PCR-Puffer (200 mM Tris HCl (pH 8,4), 500 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 1,5 µl 50 mM MgCl₂, 1 µl 10mM dNTP-Set, 1 µl 5'-Primer (10 pmol/µl), 1 µl 3'-Primer (10 pmol/µl), 1 U *Taq* DNA-Polymerase und die DNA-Matrize.

Der Reaktionsansatz wurde mit ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt. Die PCR-Reaktion wurde bei 94 °C gestartet, um eine Fehlpaarung der Primer auszuschließen. Der erste Reaktionszyklus bestand aus einem fünfminütigen Denaturierungsschritt bei 94 °C, gefolgt von einem wiederkehrenden Denaturierungszyklus ebenfalls bei 94 °C für 30 sec, einem Hybridisierungsschritt (30 sec), bei dem die Primer-Oligonukleotide an die Matrizen-DNA binden und ein Polymerisationsschritt. Die Temperatur bei der die Hybridisierung der Primer an die Matrize erfolgte war vom Schmelzpunkt des Oligonukleotides abhängig und musste deshalb individuell festgelegt werden. Die Strangverlängerung erfolgte bei 72 °C, wobei sich die Länge dieses Schrittes nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes richtete; als Richtwert wurde hierfür 1 min pro kb angenommen. Die Zyklenzahlen variierten entsprechend der durchgeführten PCRs und werden hinreichend erwähnt. Die amplifizierten Fragmente wurden in Agarose-Gelen mit einem geeigneten DNA-Standardmarker analysiert.

5.4.12 Inverse PCR

Zur Bestimmung der Integrationsorte der Genfalle wurden die den Provirus flankierenden genomischen Sequenzen mit Hilfe der inversen PCR identifiziert. Dazu wurden zunächst 5 µg genomische DNA aus den Klonen mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease (*Pst*I, *Sal*I) verdaut. Nachdem die Reaktionsprodukte aufgereinigt (QIAquick) und in 50 µl Wasser eluiert wurden, konnten im nächsten Schritt die entstandenen Fragmente in einer Ligationsreaktion zirkularisiert werden. Der aufgereinigte (QIAquick) Reaktionsansatz wurde mit 60 µl 10 x Ligase-Puffer (NEB), 3200 U (NEB) T4 DNA-Ligase und Wasser auf ein Volumen von 600 µl gebracht und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Vor der Amplifikation wurde der Ansatz noch mal aufgereinigt (QIAquick) und in 40 µl Wasser eluiert. 2 µl aus diesem gereinigten Ligationsansatz wurden als Matrize in die PCR eingesetzt. Die eingesetzten Primer bzw. "nested primer" hybridisierten an das Cre-Reportergen und in der "unique-Region" des Provirus. Als Enzym wurde eine "Platinum *Taq* Polymerase" zugesetzt, welche eine "Heiß-Start" Amplifikation von DNA-Fragmenten mit erhöhter Spezifität ermöglicht. Dies wird durch die Bindung eines thermolabilen Inhibitors an die *Taq* Polymerase erreicht; hierbei handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper. Während des ersten Denaturierungsschrittes wird der Antikörper denaturiert und das aktive Enzym freigesetzt. Es wurden 30 Zyklen durchgeführt, wobei die Hybridisierungstemperatur bei 57 °C lag und die Strangverlängerung 2 min dauerte. Für die "nested-PCR" wurde 1 µl einer 1:10 Verdünnung aus der ersten PCR als Matrize eingesetzt. Die Amplifikationsbedingungen waren identisch zu der ersten PCR. Nach Beendigung der PCR wurde ein Aliquot auf einem 1,2 % Agarose-Gel

analysiert. Die PCR-Produkte wurden ohne weitere Aufreinigung direkt in einen T-Vektor kloniert.

5.4.13 Klonierung von PCR-Produkten in einen T-Vektor

Die in der inversen PCR amplifizierten Fragmente wurden in einen T-Vektor kloniert und anschließend in Bakterien transformiert. Dazu wurde das "pGEM-T Easy" System der Firma Promega eingesetzt. Der Vektor ist bereits mit *EcoRV* verdaut und an den 3'-Enden mit einem terminalen Thymidinmolekül versehen. Dadurch wird eine Religation des Vektors verhindert und es besteht ein kompatibler Überhang für PCR-Produkte verschiedener thermostabiler DNA-Polymerasen, wie der *Taq* Polymerase, die ein terminales Desoxadenosinmolekül matrizenunabhängig an den 3'-Enden der Produkte anfügt. Das Protokoll orientierte sich an den Vorgaben des Herstellers, es wurden 2 µl aus den PCRs in die Ligation eingesetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 µl aus der Ligationsreaktion nach Herstelleranleitung in 50 µl superkompetente *E.colis* (Stratagene) transformiert und eine "blau-weiß Selektion" durchgeführt.

5.4.14 Kolonie-PCR

Die in den T-Vektor klonierten Inserts wurden mit Hilfe einer schnell durchzuführenden, standardisierten Kolonie-PCR identifiziert. Dazu wurden von jeder Transformation Bakterienkolonien, direkt von der Agar-Platte, mit einer Pipettenspitze abgenommen und in 20 µl LB-Medium resuspendiert. Davon wiederum wurden 5 µl als template in eine Standard-PCR, wie bereits beschrieben, eingesetzt. Die Bindungsstellen der eingesetzten Primer univ(-47) und rev(-48) liegen flankierend zu den inserierten PCR-Fragmenten. Die Hybridisierungstemperatur betrug 64 °C, der Syntheszyklus dauerte 2 min, wobei sich die gesamte Reaktion über 30 Zyklen erstreckte. Die PCR-Amplifikate wurden in einem analytischen Agarose-Gel analysiert.

5.4.15 DNA-Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des "BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit" der Firma ABI, nach dem Prinzip der Dideoxy-Abbruchmethode von F. Sanger. Dabei wird die zu sequenzierende DNA neben den vier Desoxynukleosidtriphosphaten mit einer thermostabilen DNA-Polymerase und den vier Dideoxyribonukleosidtriphosphaten versetzt. Diese enthalten jeweils am Heterozyklenanteil einen Basen-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff. Dadurch werden die durch Termination der Polymerase-Reaktion erzeugten DNA-Fragmente

spezifisch markiert und können aufgrund ihrer Fluoreszenz mit einem Laser-basierten Detektionssystem nachgewiesen werden. Die Verlängerungs- und Terminationsreaktionen wurden in den verfügbaren PCR-Cyclern durchgeführt. Der Reaktionsansatz von 20 µl wurde auf Eis zusammenpipettiert: 4 µl Cycle Sequencing Mix, 1 µl Primer (10 pmol/µl), ca. 200 ng Plasmid-DNA.

Um freie Fluoreszenz-markierte Nukleotide vom Reaktionsansatz abzutrennen, wurden "Centri Sep Säulen" (BD Biosciences) nach Angaben des Herstellers verwendet. 4µl des gereinigten Durchflusses wurden mit 12 µl TSR-Puffer versetzt und nach einem Denaturierungsschritt für 2 min bei 95 °C in das Ladegerät des Sequenzierautomaten gestellt. Ebenso wie bei klassischen Methoden zur DNA-Analytik werden auch die Fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Hierfür werden Polymer-gefüllte Glaskapillaren benutzt. Zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe passieren die Fragmente einen Bereich des Systems, in den der Laserstrahl fokussiert ist. Das zeitgleich emittierte Licht wird über Spiegelsysteme zur Detektionseinheit zurückgestrahlt. Das Emissionslicht, welches die Fluoreszenzfarbstoffe entsenden, wird durch einen Spektrographen in seine Spektralfarben zerlegt. Die zeitgleiche Detektion der Spektralfarben erfolgt mit dem hochauflösenden Pixelfeld einer CCD-Kamera. Die Erfassung und Verarbeitung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe eines Computers und dem Auswertungsprogramm "Abi Prism Sequencing Software".

5.5 RNA-Methoden

Alle Materialien und Lösungen wurden ausschließlich für RNA-Arbeiten reserviert und RNase-frei gehalten. Es wurde stets mit Einmal-Handschuhen gearbeitet, wenn möglich wurden sterile und RNase-freie Plastikmaterialien verwendet. Glasgefäße wurden für 4 h bei 200 °C sterilisiert. Alle Lösungen wurden mit DEPC-H₂O angesetzt.

5.5.1 Extraktion von Gesamt-RNA und polyA⁺-RNA aus eukaryontischen Zelllinien

Zwischen 1×10^6 und 1×10^7 Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß transferiert. Die Präparation wurde mit Hilfe des "RNeasy Mini Kit" von QIAGEN nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die gewonnene RNA wurde in 80 µl DEPC-H₂O eluiert. Für die

Isolierung von polyA⁺-RNA wurde das "Oligotex mRNA Mini-Kit" des gleichen Herstellers verwendet. Die Elution erfolgte in 40 µl Puffer.

5.5.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der RNA wurde mit Hilfe des "Agilent 2100 Bioanalyzer" (Agilent Tech.) ermittelt. Der Vorteil dieser Technologie ist die leichte und schnelle Analyse der Ansätze, wobei bereits sehr geringe Mengen an RNA-Ausgangsmaterial (5 ng) ausreichen, um einen Eindruck von der Reinheit und Menge der RNA-Präparationen zu bekommen. Nachdem die Ansätze auf den Chip geladen wurden, arbeitet das System vollautomatisch und stellt die Resultate graphisch, tabellarisch und in einem elektrophoretisch ermittelten Bild dar. Die Analysen erfolgten nach den Anweisungen des Herstellers.

5.5.3 Synthese von cDNA durch reverse Transkription

Es wurden 2 µg Gesamt-RNA in die Reaktion eingebracht. Als Enzym für die cDNA-Synthese wurde die "SuperScript II reverse Transkriptase" von Invitrogen verwendet. Die als Primer eingesetzten Zufalls-Hexamere stammten von Amersham Biosciences (pd(N₆) random hexamers). Folgende Komponenten wurden in die Reaktion gegeben: 2 µg Gesamt-RNA, 1 µl dNTP (10 mM) und 250 ng Random-Primer wurden mit DEPC-H₂O auf 12 µl aufgefüllt und für 5 min auf 65 °C erhitzt, um die RNA zu denaturieren. Anschließend wurde der Ansatz sofort auf Eis gebracht und folgende weitere Komponenten zugegeben: 4 µl 5 x First Strand Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2µl 0,1 M DTT, 1 µl RNAsin (40 U/µl). Der Ansatz wurde für 10 min bei 25 °C belassen und anschließend für 2 min auf 42 °C erhitzt, bevor die reverse Transkriptase (1 U) zugegeben wurde und der Ansatz für 90 min bei der gleichen Temperatur inkubiert wurde. Die Reaktion wurde durch eine Enzyminaktivierung für 15 min bei 70 °C und durch die Zugabe von 1 µl RNaseH (2U) bei nochmaliger Inkubation bei 37 °C für 20 min beendet. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

5.5.4 Northern-Blot Analyse

5.5.4.1 Elektrophoretische Auftrennung von RNA

Die RNA-Elektrophorese wurde unter denaturierenden Bedingungen durch Formaldehyd im Agarose-Gel durchgeführt. Dazu wurden 1,5 g Agarose mit 15 ml 10 x MOPS-Puffer gemischt und in 127,5 ml DEPC-H₂O aufgeköcht. Nach einer Abkühlung für etwa 15 min

wurden 7,5 ml Formaldehyd-Lösung (37 %), unter dem Abzug, zugegeben und die Lösung in den Gelträger gegossen. Als nächstes konnten die RNA-Versuchsansätze vorbereitet werden. Dabei wurden 4,5 µl polyA⁺-RNA mit 11 µl Denaturierungspuffer gemischt und für 20 min bei 65 °C denaturiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Als Laufpuffer für die Elektrophorese diente 1 x MOPS-Puffer. Es wurden 4 µl 6 x RNA-Ladepuffer zu den RNA-Lösungen gegeben. Nach dem Auftragen der Ansätze wurde eine Spannung von 8 V/cm Gellänge an die Elektrophoresekammer angelegt.

10 x MOPS-Puffer: 0,4 M MOPS, 0,1 M Natriumacetat, 10 mM EDTA

2 x RNA-Denaturierungspuffer: 10 µl Formamid, 3,5 µl Formaldehyd (37 %), 2 µl 10 x MOPS

5.5.4.2 Kapillartransfer von RNA auf Nylon-Membranen

Vor dem Transfer wurde das Gel in 2 x SSC-Puffer äquilibriert. Der Kapillartransfer auf eine Nylonmembran ("Hybond N⁺", Amersham) wird durch die Saugkraft von Filterpapier geleistet, das den Transferpuffer aus einem Vorratsgefäß durch das Gel und die Membran saugt, wobei die RNA an der Membran haften bleibt. Dazu wurden in einem Gefäß 2 x SSC vorgelegt und ein Stapel Whatman-Papier, das in etwa die Größe des Gels umfasst, hineingelegt. Auf den Stapel wurde das Gel, mit der Oberseite nach unten, und darauf eine exakt zugeschnittene Nylon-Membran positioniert. Zwei weitere befeuchtete Filterpapiere und letztlich ein Stapel Saugpapier folgten. Der Transfer erfolgte über Nacht. Nachfolgend wurde die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen und anschließend in Methyleneblau-Lösung geschwenkt, um die ribosomalen 18S und 28S RNAs sichtbar zu machen. Unmittelbar danach konnte die Membran entweder direkt für die Prähybridisierung verwendet werden oder alternativ zwischen mit 2 x SSC getränkten Filterpapieren in Frischhaltefolie bei 4 °C aufbewahrt werden.

20 x SSC: 3 M Natriumchlorid, 0,3 M Natriumcitrat (pH 7)

Methyleneblau-Lösung: 0,04 % Methyleneblau in 0,5 M NaAc (pH 5,2)

5.5.4.3 Radioaktive DNA-Markierung mittels asymmetrischer PCR

Mit einer asymmetrischen PCR wurden die genspezifischen Sonden zur Hybridisierung im Northern-Blot hergestellt. Bei diesem Verfahren wurde nur ein Primer zur Reaktion zugegeben, weswegen einer der beiden DNA-Stränge amplifiziert wird (asymmetrische Amplifikation). Die Anzahl der einzelsträngigen Produkte steigt aufgrund des Fehlens eines Primers auf dem anderen DNA-Strang mit jeder Vermehrungsrunde nur linear an. Deshalb wurde zunächst mit einer konventionellen PCR ein doppelsträngiges DNA-Fragment generiert, aufgereinigt (Qiaquick) und anschließend in einer asymmetrischen PCR mit nur einem Primer unter Zugabe eines radioaktiv markierten Desoxynukleotid-triphosphates vervielfältigt. Hierzu wurden 40 Zyklen durchgeführt. Die Hybridisierung bei 50 °C dauerte 45 sec und die Strangverlängerung 4 min. Folgende Komponenten wurden in die Reaktion gegeben: 1 µl 3'-Primer, 3 µl Matrize, 5 µl 10 x PCR-Puffer, 1,5 µl MgCl₂, 5 µl dNTP (2mM, dATP, dGTP, dTTP), 1 U *Taq*, 5 µl dCTP (12µM), 5 µl [³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml), 24,3 µl ddH₂O. Die Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide erfolgte über "MicroSpin S200 HR Columns" nach Angaben des Herstellers Amersham Biosciences.

5.5.4.4 Radioaktive DNA-Markierung mittels "random priming"

Alternativ zur asymmetrischen PCR wurden radioaktive DNA-Sonden mit dem "Rediprime II"-System von Amersham generiert. Diese Methode wurde für die sogenannten Haushaltsgene angewendet, deren mRNAs in relativ hohen Konzentrationen innerhalb der Zelle vorliegen. Hierbei wurde die radioaktiv zu markierende DNA in 45 µl TE-Puffer für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Danach wurde der komplette Ansatz zu dem fertigen, dehydratisierten Reaktionsmix (enthält Oligonukleotide mit Zufallssequenzen (random hexamers), gelabelte Nukleotide, DNA-Polymerase) gegeben und 5 µl [³²P]dCTP (ca. 10⁹ cpm/µl) dazupipettiert. Durch die Hybridisierung mit zufälligen Hexanukleotidprimern wird ein komplementärer Strang synthetisiert, der radioaktiv markiert ist. Die Reaktion wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Vor Zugabe zur Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte DNA, wie oben beschrieben, von nicht inkorporierten Nukleotiden abgetrennt und erneut denaturiert, um eine Hybridisierung mit membrangebundener, komplementär RNA auf der Membran zu erlauben.

5.5.4.5 Hybridisierung der transferierten RNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Die Prähybridisierung und Hybridisierung fand in einer dicht abschließbaren Glasflasche statt, die die zusammengerollte Membran enthielt. Die Inkubation wurde in einem

Hybridisierungssofen durchgeführt, der für eine konstante Temperatur und durch Rotation der Flaschen für eine gleichmäßige Benetzung der Membran mit der Hybridisierungslösung sorgte. Die Hybridisierung wurde mit der "UltraHyb" Hybridisierungslösung von Ambion durchgeführt. Es wurde nach den Vorgaben des Herstellers verfahren und immer über Nacht hybridisiert. Die Prähybridisierung dauerte 30 min. Durch anschließendes Waschen der Membran wurden unspezifisch haftende Sondenmoleküle entfernt. Die Waschschritte wurden nach den Vorgaben von Ambion durchgeführt, wobei der letzte Waschschritt zur Stringenzerhöhung modifiziert wurde. Die Membran wurde wie folgt gewaschen: 2 x 5 min mit 2 x SSC/0,1 % SDS bei 42 °C, 1 x 15 min mit 0,1 x SSC/0,1 % SDS bei 42 °C, 1 x 30 min mit 0,1 x SSC/0,1 % SDS bei 60 °C. Zuletzt wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen, mit einem Kodak X-Omat Film in eine Autoradiografiekassette gelegt und bei - 80 °C gelagert. Nach Auftauen der Filmkassette konnte der Film in der Dunkelkammer entnommen und maschinell entwickelt werden. Alternativ wurden Signale von radioaktiv markierten Membranen mit einem Phosphorimager visualisiert und mit dem Programm "Image Quant" von Molecular Dynamics quantifiziert.

Sollte die Membran mit einer zweiten Sonde hybridisiert werden, musste zunächst die erste Sonde entfernt werden. Dazu wurde eine SDS-Lösung (0,1 %) aufgekocht, die Membran in die heiße Lösung gelegt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Das erfolgreiche Entfernen der Sonde wurde durch eine anschließende Autoradiografie überprüft. Eine Sonde konnte nur dann entfernt werden, wenn die Membran zuvor nie getrocknet war.

6 Literatur

1. Foulds, L. The experimental study of tumour progression. London Academic Press. 1954, Vol. I-III.
2. Nowell, P.C. The clonal evolution of tumour cell populations. *Science*, 1976, Vol. 194, 23-28.
3. Hanahan, D., Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, Vol. 100, (1), 57-70.
4. Kerr, J.F.K., Wyllie, A.H., Currie A.H. Apoptosis a basic biological phenomenon with wider implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972, 26, 239-245.
5. Ellis, H.M., Horvitz H.R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *c. elegans*. *Cell*, 1986, 28, 44 (6), 817-829.
6. Kerr, J.F.K., Winterford and B.V. Harmon. Apoptosis its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994, 2013-2026.
7. Wyllie A.H. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. *Cell Death in Biology and Pathology*, ed. Bowen, I.D., Lockshin. R.A., 1981, pp 9-34. London: Chapman & Hall.
8. Mehendale. H.M. Amplified interactive toxicity of chemicals at non-toxic levels: mechanistic considerations and implications to public health. *Environ. health persp.* 1994, 102, 139-149.
9. Thompson, C. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995, Vol. 267, 1456-1462.
10. Evan, G., Littlewood, T. A matter of life and cell death. *Science*, 1998, Vol. 281, 1317-1322.

11. Schmitz, I., Kirchhoff, S., Krammer, P.H. Regulation of death-receptor mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2000, 32, 1123-1136.
12. Zamzami, N., Kroemer, G. The mitochondrion in apoptosis: how pandora's box opens. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001, 2, 67-71.
13. Martinou, J.C., Green D.R. Breaking the mitochondrial barrier. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 2001, 2, 63-67.
14. Alnemri, E.S. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J. Cell Biol.*, 1997, 64, 33.
15. Green D.R. Apoptotic Pathways: The Roads to Ruin. *Cell*, 1998, Vol. 94, 695-698.
16. Salvesen, G., Dixit, V. Caspases: intracellular signalling by proteolysis. *Cell*, 1997, Vol. 91, 443-446.
17. Adams, J.M., Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 1998, Vol. 281 (8), 1322-1325.
18. Deveraux, Q.L., Reed J.C. IAP family proteins – suppressors of apoptosis. *Genes Dev.* 1999, 13, 239-252.
19. Crook, N.E., Clem R.J., Miller L.K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J. Virol.*, 1993, 67 (4), 2168-2174.
20. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 2000, 7, 102 (1) 33-42.
21. Ishida, T., Yarimizu, K., Gute, D.C., Korthuis, R.J. Mechanisms of ischemic preconditioning. *Shock* 1997, 8, 86-94.

22. Wempe, F., Yang, J.Y., Hammann, J., von Melchner, H. Gene-trapping identifies transiently induced survival-genes during programmed cell death. *Genome Biol.* 2001, 2 (7).
23. Jacobson, M., Weil, M., Raff, M. Programmed cell death in animal development. *Cell*, 1997, Vol. 88, 347-354.
24. Micheau, O., Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signalling complexes. *Cell*, 2003, Vol. 114, 181-190.
25. Sen, R., Baltimore, D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappaB by a posttranslational mechanism. *Cell*, 1986, Dec. 26, 47(6).
26. Kucharczak, J., Simmons, M.J., Fan, Y., Gelinas, C. To be or not to be: NF- κ B is the answer-role of Rel/NF- κ B in the regulation of apoptosis. *Oncogene*, 2003, 22, 8961-8982.
27. Bhat, K., Mc Burney, M.W., Hamada, H. Functional cloning of mouse chromosomal loci specifically active in embryonic carcinoma stem cells. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, 8, 3251-3259.
28. Gossler, A., Zachgo, J. Gene and enhancer trap screens in ES cell chimeras. *Gene targeting: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford U.K., 1993, 181-227.
29. Hill, D.P., Wurst, W. Gene and enhancer trapping: mutagenic strategies for developmental studies. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 1993, 28, 181-206.
30. Meisler, M.H. Insertional mutation of classical and novel genes in transgenic mice. *Trends Genet*, 1992, 8, 341-344.
31. Rossant, J., Hopkins, N. Of fin and fur: mutational analysis of vertebrate embryonic development. *Genes Dev.* 1992, Vol. 6, 1-13.

-
32. von Melchner, H., De Gregori, H., Rayburn, S., Reddy, C., Ruley, H.E. Selective disruption of genes expressed in totipotent embryonic stem cells. *Genes Dev.* 1992, Vol. 6, 919-927.
 33. Spradling, A.C., Stern, D.M., Kiss, I., Roote, T. Lavery, Rubin, G.M. Gene disruptions using P disposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995, 121, 3797-3807.
 34. Schier, A.F., Joyner, A.F., Lehmann, R., Talbot, W.S. From screens to genes: prospects for insertional mutagenesis in zebrafish. *Genes Dev.* 1996, Vol. 10, 3077-3080.
 35. Russ, A.P., Friedel, C., Ballas, K., Kalina, U., Zahn, D., Strebhardt, K., von Melchner, H., Identification of genes induced by factor deprivation in hematopoietic cells undergoing apoptosis using gene trap mutagenesis and site-specific recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, 93, 15279-15284.
 36. Yanez, R.J., Porter, A.C.J. A chromosomal position effect on gene targeting in human cells. *Nucleic Acid Research*, 2002, Vol. 30 No. 22.
 37. Wu, X., Li, Y., Crise, B., Burgess S., M. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*, 2003, Vol. 300, (6), 1749-1751.
 38. Li, J., Shen, H., Himmel, K.L., Dupuy, A.J., Largaespada, D.A., Nakamura, T., Shaughnessy, J.D., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. Leukaemia disease genes: large-scale cloning and pathway predictions. *Nature Genetics*, 1999, Vol. 23, 348-353.
 39. Osipovich, AB., White-Grindley, EK., Hicks, GG., Roshon, MJ., Shaffer, C., Moore, JH., Ruley, HE. Activation of cryptic 3' splice sites within Introns of cellular genes following gene entrapment. *Nucleic Acid Research*, 2004, Vol. 32, No. 9, 2912.
 40. Lavorgna, G., Dahary, D., Lehner, B., Sorek, R., Sanderson, C.M., Casari, G. In search of antisense. *Trends in Biochemical Sciences*, 2004, Vol. 29, No. 2.

41. He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J., Hammond, S. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005, Vol. 435 (7043), 745-6.
42. Meltzer P.S. Small RNAs with big impacts. *Nature* 2005, Vol. 435, (7043), 828-33.
43. Williams, T.M., Medina, F., Badano, I., Hazan, R.B., Hutchinson, J., Muller, W.J., Chopra, N.G., Scherer, P.E., Pestell, R.G., Lisanti, MP. Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. *J.B.C.* 2004, Vol. 279, 49, 51630-51646.
44. Bosilevac, J.M., Olsen R.J., Bridge, J.A., Hinrichs, S.H. Tumour cell viability in clear cell sarcoma requires DNA binding activity of the EWS/ATF1 fusion protein. *J.B.C.*, 1999, Vol. 274, 49, 34811-34818.
45. Diamond, R.H., Cressman, D.E., Laz, T.M., Abrams, C.S., Taub, R. PRL-1 a unique nuclear protein tyrosine phosphatase, affects cell growth. *Mol. Cell. Biol.*, 1994, 14, 3752-3762.
46. Zohn, I.M., Campbell, S.L., Khosravi-Far, R., Rossmann, K.L. Rho family proteins and Ras transformation: the RhOad less travelled gets congested. *Oncogene*, 1998, 17, 1415-1438.
47. Ramos, S., Khademi, F., Somesh, B.P., Rivero, F. Genomic organization and expression profile of the small GTPases of the RHOBTB family in human and mouse. *Gene* 2002, 298, 147-157.
48. Satijn, D.P., Olson, D.J., van der Vlag, J., Hamer, K.M., Lambrechts, C., Masselink, H., Gunster, M.J., Sewalt, R.G., van Driel, R., Otte, A.P. Interference with the expression of a novel human polycomb protein hPc2, results in cellular transformation and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, 1997, 17 (10), 6076-6086.
49. Thorey, I.S., Muth, K., Russ, A.P., Otte, J., Reffellmann, A., von Melchner, H. Selective

- disruption of genes transiently induced in differentiating mouse embryonic stem cells by using gene trap mutagenesis and site-specific recombination. *Mol. Cell. Biol.*, 1998, May 18 (5), 3081-8.
50. Whitman, S., Wang, X., Shalaby, R., Shtivelman, E. Alternatively spliced products CC3 and TC3 have opposing effects on apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, Vol. 20, No. 2.
51. King, F.W., Shtivelman, E. Inhibition of nuclear import by the proapoptotic protein CC3. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, Vol., 24, No. 16.
52. Ono, K., Iwanaga, Y., Hirayama, M., Kawamura, T., Sowa, N., Hasegawa, K. Contribution of caveolin-1 α and Akt to TNF α -induced cell death. *Am J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2004, Vol. 287, L201-209.
53. Feng, X., Gaeta, M.L., Madge, L.A., Yang, J.H., Brdley, J.R., Pober, J.S. Caveolin-1 associates with TRAF2 to form a complex that is recruited to tumor necrosis factor receptors. *J.B.C.*, 2001, Vol. 276, No. 11, 16, pp. 8341-8349.
54. Frith, M.C., Pheasant, M., Mattick, J.S. The amazing complexity of the human transcriptome. *Eur. J. Hum. Genet.* 2005, Vol. 13, 894-897.
55. Mattick, J.S. The functional genomics of noncoding RNA. *Science*, 2005, Vol. 309, 1527-1528.
56. Szymanski, M., Barciszewska, M.Z., Zywicki, M., Barciszewski, J. Noncoding RNA transcripts. *J. Appl. Genet.* 2003, 44 (1), 1-19.
57. Mattick, J.S. RNA regulation: a new genetics ? *Nat. Rev., Genetics* 2004, (5), 316-323.
58. Hüttenhofer, A., Vogel, J. Experimental approaches to identify non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research*, 2006, Vol. 34, No. 2, 635-646.

-
59. Carrington, J.C., Ambros, V. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 2003, 301 (5631), 336-338.
60. Kim, V.N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005, May 6 (5), 376-85.
61. Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I.K., Preiss, T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *PNAS*, 2005, Vol. 102, No. 47, 16961-16966.
62. Gebauer, F., Hentze, M.W. Molecular mechanisms of translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2004, Vol. 5, 827-835.
63. Hwang, H.W., Mendell, J.T. MicroRNAs in cell proliferation, cell death and Tumorigenesis. *Br. J. Cancer*, 2006, March 27, 94 (6), 776-80.
64. Alvarez-Garcia, I., Miska, E.A. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*, 2005, Vol. 132, 4653-4662.
65. Pang, K.C., Frith, M.C., Mattick, J.S. Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. *Trends in Genetics*, 2006, Vol. 22, No. 1, 1-5.
66. Costa, F.F. Non-coding RNAs: new players in eukaryotic biology. *Gene*, 2005, Vol. 357, 83-94.
67. He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S, Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J., Hammond, S.M. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005, Vol. 435, 828-833.
68. Askew, D.S., Li, J., Ihle, J.N. Retroviral insertions in the murine His-1 locus activate the expression of a novel RNA that lacks an extensive open reading frame. *Mol. Cell Biol.*, 1994, Vol. 14 (3), 1743-1751.

-
69. Tam, W., Hughes, S.H., Hayward, W.S., Besmer, P. Avian bic, a gene isolated from a common retroviral site in avian leucosis virus-induced lymphomas that encodes a noncoding RNA, cooperates with c-myc in lymphomagenesis and erythremoleukemogenesis. *J. Virol.* 2002, 76 (9), 4275-4286.
70. Eddy, S.R. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat. Rev. Genet.* 2002, Vol. 12, 919-929.
71. Brown, C.J., Chow, J.C., Beyond sense: the role of antisense RNA in controlling Xist expression. *Semin Cell Dev. Biol.*, 2003 Dec. 14 (6), 341.
72. Yelin, R., Dahary, D., Sorek, R. Widespread occurrence of anti-sense transcription in the human genome. *Nat. Biotechnol.*, 2003, Vol. 21 (4), 379-386.
73. Bussemakers, M.J. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Research*, 1999, Vol. 59 (23), 5975-5979.
74. Srikantan, V., Zou, Z., Petrovics, G. PCGEM1, a prostate-specific gene, is overexpressed in prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, Vol. 97 (22), 12216-12221.
75. Trinklein, N.D., Aldred S.F., Hartmann, S.J., Schroeder, S.I., Otilar, R.P., Myers, R.M. An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Research*, 2004, Vol.14 (1), 62-6.
76. Hansen, J.J., Bross, P, Westergaard, M., Nielsen, M.N., Eiberg, H., Borglum, A.D., Mogensen, J., Kristiansen, K., Bolund, L., Gregersen, N. Genomic structure of the human mitochondrial chaperonin genes: HSP60 and HSP10 are localised head to head on chromosome 2 separated by a bidirectional promoter. *Human Genet*, 2003, Vol. 112, (1), 71-77.
77. Nakanishi, C, Toi, M. Nuclear factor- κ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nature Rev. Cancer*, 2005, Vol. 5, 297-308.

-
78. Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., Li, Z.W. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Rev. Cancer*, 2002, Vol. 2, 301-310.
79. Rayet, B., Gelin, C. Aberrant rel/NF-kappaB genes and activity in human cancer. *Oncogene*, 1999, Vol. 18, Nov. 22, 6938-6947.
80. Biswas, D.K., Shi, Q., Baily, S., Strickland, I., Ghosh, S., Pardee, A.B., Iglehart, J.D. NF- κ B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *PNAS*, 2004, Vol. 101, No. 27, 10137-10142.
81. Bentires, M. Kappa-B nuclear factor and apoptosis of cancerous cells. *Bull. Mem. Acad. R. Med. Bel.*, 2001, 156, 329-337.
82. Goldman, B. For investigational targeted drugs, combination trials pose challenges. *J.Natl. Cancer Inst.*, 2003, 95, 1744-1746.
83. Ali, I.U., Schriml, L.M. and Dean M. Mutational spectra of PTEN/MMCA1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1999, 91, 1922-1932.
84. Maehama, T., Dixon, J.E. The tumor suppressor PTEN/MMCA1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.*, 1998, May 29, 273 (22), 13375-13378.
85. Bellacosa, A., Kumar, C., Di Cristofano, A., Testa, J.R. Activation of Akt-kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv. Cancer Res.*, 2005, 94, 94, 29-86.
86. Mac Keigan, J.P., Murphy, L.O., Blenis, J. Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nature Cell Biol.*, 2005, Vol. 7, No. 6, 591-600.
87. Wang, Z. Mutational analysis of the tyrosine phosphatase in colorectal cancers.

Science, 2004, Vol. 304, 1164-1166.

88. Narayan, G. Genetic analysis identifies putative tumor suppressor sites at 2q35-q36.1 and 2q36.3-q37.1 involved in cervical cancer progression. *Oncogene*, 2003, Vol. 22, 3489-3499.
89. Peng, Y., Du, K., Ramirez, S., Diamond, R.H., Taub, R. Mitogenic up-regulation of PRL-1 proteine-tyrosine phosphatase gene by Egr-1 activation is an early event in liver regeneration. *J. Biol. Chem.*, 1999, Vol., 274, 4513-4520.
90. Cates, C.A., Michael, R.L., Stayrook, K.R., Harvey, K.A., Burke, Y.D., Randall, S., Crowell, P.L., Crowell, D.N. Prenylation of oncogenic human PTP (CAAX) protein tyrosine phosphatases. *Cancer Lett.*, 1996, Vol. 110, 49-55.

7 Anhang

Zusammenfassung der mit Hilfe der iPCR ermittelten Genfallen-flankierenden, zellulären Sequenzen. Es sind alle Klone aufgeführt, die in die Datenbankanalyse eingegangen sind (siehe Tabelle). Die 5'-Provirussequenzen wurden entfernt.

H-8-M50

ATATAGAGGT	GAGAGGGGCA	GGGATGAGAT	AGCAGAGCAC	CTGGGCAGCC
CTCGTGTCTT	AGAAAGGACC	TGGGTCCCAA	GACCCTCGAG	GCCAGGAGCG
TATACCACGG	CAAGGTGGAT	CTTCATGGGC	TATAGTATCT	AGACAGGCCA
TCTCTTGAGA	ATTCTTTCTG	AGAACTACCT	GACAAACTTT	CTTGGTCAGG
GCATCGCAGG	CAATTCTTTA	AAGAGTCTGT	ATAAATAATC	ATATAACACA
ATTTTAACT	ATTTATAGGA	GAAGAAAAAT	CCACACTCAT	GTGACTCAGA
TNCAAGAATT	GGTGCCACC	CCCAACNCTA	ACTTNCACTT	ACATGACACT
TNCTTTATCG	CAGAATGCAN	AGACTGCCCA	AAACTGCTGG	TTGGAGCCTT
NTGTCNACAT	GCTGTGGCAC	TGTGCCTGAA	ATGGNCGGTT	T

H-8-M52

GTACCTCAAC	CCCCACTCTC	TCTAATTTAC	TAGAAACCAA	ACGGACTGTT
TAGAAGCCCT	CAGCCTGGCA	GTCTGGGTTG	GGGTTTTTCT	GGGGGGTGGG
TTGGGGCGGG	GGTTGTTTTA	TTTTTTTGCT	ATTCTCCTTT	GACCAAAAGG
GCCATTAATT	GTTGGGAGTT	TGAAAGCTAC	CTGATTCCAT	GAAACAGAGG
GGATTTCCAT	GAGTAATAAT	TCAGACCGTG	CTTGTGTAGG	GCGCTGTGGC
TCGAGTAAAT	TGATCCAGCT	GCTTGCAAAA	GCTCATGGAA	AACGGCCCCG
GGGAGAGGAC	GGCGCNTCTG	CAGCAGACAA	GACCGCGCTT	CGGNTCCAAN
CGAAGCCAAA	ATTCAAACGG	NGCNNAACTT	TTTANGGNCC	CGGNTCCAAC
NNAACCNATT	TCC			

H-8-M53

CAAGGAGAGG	CTTCTCTTTC	TCTCCCTGCT	AGG TTCAGGA	GACCCTTGCA
GTGAGAGCAA	TTAACAGCAT	AAACTGGATT	AACGGTATCC	TCTTGACCCT
ATCTTCTGGA	TACTTGTCAA	ATTATGGTTC	TTCAAATATT	TCTTTTTTTC
AAGAGTAGTG	CCATGGAGTG	GAGCTTTCTG	GGGTGCCTCC	CATGGACCAC
ACACATTGGT	AGGGTGCTTT	TGCATCTATA	AATCCTTGAC	GTTCATGAGG
GCTTGGTTCT	AAGAACTTTT	GAGAATCCTC	AGATTCTTGG	AATTCTACTT
TAATGNATGG	NTCCTGGNNT	TAAAATCCAT	GAAGACCNGG	GNTCTTATAC
CAATTTCCCT	CAAAGNGTAT	ATTCCAGGNT	TCAATGAAAT	CCTTTTTTAA
ANAAAACCG	GGTTGNAAA	TGGGNACTAA	ACCCTGAAAT	TCAGGCCATT
TA				

H-8-M54

AGTGTACATT	CAGTTTAGTA	CACATTTAGT	ACACAAACAT	CTTGTGGTCA
------------	------------	------------	------------	------------

TTTTGCCACT	TTTCTGAAGG	AGGTAGCATC	TTAAAGATCA	GTGTCCTAAT
GGGCGTTTCT	TTTCTCCCAG	GCTGGAAGAA	TTGAGACTGG	TTTGATTTTA
TTTTAAGCCT	TTGTATAGCT	CTTTGTGAAG	ATNACTTAGT	ACAAATGCTA
AACAAGAGAG	CATCACCCAT	TTGGTTTGGC	CTTTTCAAAA	TTTACATCCA
TCTAACTTGG	ATCCAAACCA	GCCACTTCTC	TTTACCANGA	ACCCATAACT
TGNTCACTTG	GCACGCANGG	ACTCCTGTAG	CCNAAACTTA	AGTATTGCCN
CACANAGGGG	NAAGGGAAGC	TTGTTTTTAC	TGNAGGAAGT	NGGC

H-8-M55

GATTCAATAG	CTTTCAAACC	AGAGTAAAAT	ACTAATGAGC	CAAACCTGGAT
GTGGGCAGGG	TTGGGGGTAA	GGGGAGTAAA	AGAGACAAAA	GCAAAAATAA
CCTAGAGTAA	GATTTGGCTA	AATGATGAAT	TCCTGTTTAA	GATAAACTTC
AAAAGTCCGC	TAAATGGCAA	AGCACTTCCT	TGAACTCTAA	AGAGAAATTG
GGTGCTATTT	TTTTTCTTAC	TCCACAATG	AGACTTTTTT	TATCATCTGG
ATAANAGGAG	TATCATGTTT	GGTTAAGAAT	GGGATAATCG	AAATCAGCTT
CCTTTGGCCT	CTTATAGCCA	TGGCTCANGT	ATTTAGCCTG	GGNGGGACAT
TGCTATGAAG	ATGCCACANT	TAGANTCCNA	GCCNGGCCGN	TTTTCAATCC
ATGCCTCCAA	ACTG			

H-8-M56

AGCCTCTCAG	ACAAGGTACC	ATCTTATCCT	ACTATGAAAG	TAACATATTT
AAAGGATGAA	AAAATAAGGC	TTTTGCTGTT	GAGAGAAATG	ATGCATTTTA
TTTTATGTAT	TTATTTGAGA	TGGAGTCTTG	CTCTTTTGCC	CAGGTTGGAG
CACAGTGGTG	CAATCTTTGC	TCACTGCAAC	CTCAGCCTCC	TGGGTTCCAG
CAATCTCCT	GCCTCACCTC	CCAAGTAGCT	GGGANTACAG	CCACTGCCAC
CACACCTGGC	TAATTTGNTT	GGACCTTTAG	AAAACCTCCTG	TTGCTAGGCC
AGGTTTGAAT	CCTGACTCAA	GAGACTGCTG	CTCAGCTNCC	AANGAAGGCN
CGTTTAANCA	GAATTAA			

H-8-M57

CCTACTATTA	GAGGACACCC	TTGCNCNNTT	TCTTANNNG	AGNNGATTAA
AGCANCATNT	ANNTANCGCN	NGCNAACTCA	AAGTACCAGG	GGTNCCCAGT
GANGCCCNGG	GTTTTTGGGT	CTTTTAAAGA	ATCCNTTCNN	AATTTAATNT
AANANTTTGN	ACAACATTGG	NGCACCNNA	CCCCTNTCNT	AANTAAGTGC
CNGNGTTATA	AGTGNCNAAG	TCTCATTENN	ATCTTCCTGA	AAGGGCNANN
CCAANCCNTA	TTCNCTTAGN	ATNTTTTGGG	CTTTTAAAA	AATCNNTTT
NATTGAGGCC	AAAAATTTTG	NCAAAANATT	CCCNNGGTNN	TNAAANNGGG
GTCCCANCCCT	TATANGGGGT	TTTATNGAAA	AGGCTAAACC	CCCNNTTTTC
GGGTTTCNNA	TANCCNNATN	ANTTTTTANC	TTGNGGGGGG	NNAANCTTTT
GGNTTTNGAA	AACTCCNGGA	GCNCAAATNN	TGGCCGT	

H-8-M66

GAGNNTCACA	AGAACTATGT	TTTGTGCTAA	CAGAAGGGCC	TACAGCAGGA
AAGGACGTTT	TGCTCAGTCT	AGTGGAGCAC	CTAAGGAGTT	TGCACCCTTT
TCTGTGTTAG	GGTGTAGGTG	TGTGTACACT	CTTCACTGGA	TATGTCTTCC
TCTCCTGCAG	CAGACAAGAC	GCGCGGCTTC	GGTTCCAAAC	CGAAAGCAA
AATTCAGACG	GAGGCGGGAC	TGTTTTAGGT	TCTCGTCTCC	TACCAGACCA
CATATCCTGA	CGGGGTCGGA	TTCCACATCG	ACTCCCTTCC	TAAGGTCCGG
CACAAAAACG	GCCCCAAAGT	CCCTGGGACG	TCTCCAAGGG	TTGCGGCCGG
GTGTTTCAGAA	CTCGNAGGTT	CANCACGGTA	ATCACTAGNG	AAATCGCGGC

CGCTTCAGGT TTTA	NGACATTTGG	AAAACCTCAA	AGCGTGGANC	AAACTTGGA
--------------------	------------	------------	------------	-----------

H-8-M78

GNGTNAAGCA	GGGCGNGANT	NCAGTNNTTG	AACCNTGNGN	CNCNTGCNGA
AGANTGGCNT	AAACGCNGCA	GCNCTNANNC	NTGANGTNCC	GGACTAANCT
TGGNANGCAC	GANTTATNNT	NACTNTGNGA	CCTNNNANNC	ANCAGGGCCC
TTANTNNNAT	AGANNAGTTN	TGTNGCANNC	ATTCCATGCT	ATCCTGTGCC
TTGCATCCTN	TNTNCTGGCT	GCGACANTTG	CNTNFCATGA	ACTGGTTNAG
CTGNCTAGCG	TATCANNGAA	ANAGCTTTGC	CTAATGCCTT	ATGCAGCATC
NACGAGGAAA	NAGNANTTTA	AAAGCCTAAG	GACTTNTTGN	TTATTTAACC
CGGGTTNNGN	TTCCAACGGC	NGCCNNATTT	AAAAGNGGCC	GTNCTNTTTT
AGGGGNGGGN	NCCAACTTTT	CCNAAATNCG	GCCNGNNCNN	TTCCCAAAA
AA				

H-8-M85

GACTGTCATA	CAAATAGAAA	ATGAACACGT	CAAAGGTTTT	ATTTTATTCA
CCAATTAATG	AGGAAACCCT	AAGGTGTAA	ACTGGGTTCA	AAGGGAGAAT
TCAAAGACCA	GACGCCTATG	TAGGCAATCA	GAAATGCCCA	GCAATGAGGA
AATGCATTTG	TTAATAGATG	CAAGACTGGG	TTTTCTCCAC	CAAACATTC
TTTGCATTGA	CTGTGGATGA	GAATCATTTA	CATTACTATG	GGTTNTTTTT
TTNGTCCATT	TTACGNGGCT	TTAANNTNGG	CNAAANCCCG	GNAAAAGGCC
NAANNTTNTT	NNANCNTTTA	GGAANCCCAA	TTAAGGNCNT	TGGGNTGCC
CCGGCNTTNN	TNAACCCNCC	CNTTGNNCCC	CC	

H-8-M91

TGACGATCAC	NAGAANCTAT	GTTTTGTGGC	TAANAGAAGG	GNCTACNGNA
GNCATAGGAC	GTTNGTGCTC	AGGCTAGNTG	GAGCANCTAN	NGAGTTTGCA
CCCTTTNNTG	AGTTAGAGGA	GNNAGTGNGN	GTACACTCTT	CACTGGNTAT
GNCTNCCTCT	CCTGCAGCNG	ACANGACGCA	GCGACNTTCG	GNTCCAAACC
GAAGCAGAAA	TTCAGACTNA	GGCGGAACTG	TTNNAGGTTC	TNGTCTNCTA
CNAGAACCAC	ATATCCTGAC	GNTGACGGAT	TCCACATCGA	CTTCTTCTCT
CAGGCTGAGC	ACANAAACGG	CCCCAAAGCC	CTGGNCCTGT	NCAAGNNTGC
GGNCGGGNGT	NAGACTNGAA	ATTACACCGG	GNAATNCTAG	NAATTGGNGC
CCCTNCGGTT	GACATTTNAA	AGNTCNAACC	CNGGNNCTAN	TTA

H-8-M105

GGGNTAAACA	AGGCATGATC	TCAGTCCTTG	AACATAGAGT	CTCGTGGAGA
AGAATGGCGT	AGAAAATGCA	GTGTCATGGA	TGTGTGATCA	TAAAAGTAAG
ATGGGTACAC	ACCACTTCAG	GAGAATGGGC	AGAGGGAGTT	AACATCTTGG
CACTTAGCAT	TTAAGTATTT	CTTCTGTAAC	ACACATTCCA	TTCTATTTTA
ATGAGCTTGC	AAACATTTTT	TCCTGCTGGA	CTTTGAGGAT	CAGGAATGTG
GTTTGGTCAC	TATCCTAATC	TCCTACGNCC	TTGGCATACT	GGCCTACAAA
TTAGGNNATG	GGGTTTATAN	TGACTCATAT	GGGCAAAGG	GCANTTTTTT
TTTTTTAAAA	AAGGTNGGGA	ACGTTCCAAA	AGCCCANGCT	TTTAAANATTT
NCCCAGGTTT	TTTTTANNAN	GGGGGGGNC	CCCNNATTTT	TTTAAAAGG

H-8-N149

CTGTCTTGGG	GGCTATTTAG	CTCTCCCTTG	GACCCATTCC	CTCTTGTCT
AGGGGAAGCA	AGCTATCATG	TTGTGAGCAG	CACAATATAG	AGGCCCATTT

GAAAAGAAAA	TAATTTCTGG	CAGCAGACAA	GACGCGCGGC	TTCGGTTCCA
AACCGAAGCA	AAAATTCAGA	CGGAGGCGGG	AACTGTTTTA	GGTTCTCGTC
TCCTACCAGA	CCACATATCC	TGACGGGGTC	CGGATTCCAC	ATCGACTCCC
TTCTCAGGT	CGGGCCACAA	AAACGGCCCC	NAAGTCCCTG	GGACGTCTCC
CAGGGTTGCG	GCCGGGTGTT	CAAGACTCGT	CAGTTCACCA	CGGGTAATCA
CTAGTGAATT	CGCGGCCGCT	GCAGGTNGAC	ATTTGGAAAG	CTCCAACGCG
TGGATGCATA	CTTGAGTNTC	TATTAG		

H-8-N152

CCAACACGTT	NAACCCCAT	ACATAACTTC	CTTTAAAAAC	GATCACACTA
GAAATCCAG	CATTTAAAAT	CCTGGAAGTT	TTCGGTAAAA	TACGCTAAAT
ATAGCTTGAA	ATAGTAAATA	ATCCCCCAA	GGCGACATTA	GCAAATTAAT
TGGTGTGTGA	ACAAAGAACT	CTTTCCGCAG	CAGACAAGAC	GCGCGGNTTC
GGTTCCAAAC	CGAAAGCAAA	AATTCAGACG	GAGGCGGGGA	CTGTTTTAGG
TTCTCGTCTC	CTACCAGAAC	CACATATCCT	GACGGGGTCG	GATTCCACAT
CGACTCCCTT	CCTCAGGTCG	GGCCACAAAA	ACGGCCCCCA	AAGTCCCTGG
ACGTCTCCAA	GGTTGCGGNC	GGGTGTTTCCAG	AACTCGTAGG	TTCACCACGG
NAATCCTAGT	GAATTCGCGG	CCGCTNAGGT		

H-8-N164

GTAGTATTGG	TTATTGTTTT	ACTGAAAAAG	AGGCAAGTTT	AAATTCTAGG
GCTTGGAAGC	AAAATGCTCA	GAAATGGGTG	TCTTTTCTTT	TCTTTTCTTT
TTTTTTTTTN	GNAAGGGGC	CCAANTTTNG	GNNNNTANGC	NGGAGGCCAG
GGTGGAANCA	AGGCNTATTG	NAACCTTNGN	CTTCAAGGTT	ANNGNCAACN
NTCCNNTTAA	ACNTTTTGGG	GGNNTTGGGA	NCCAAAAGGC	NTNGNCCCN
TGGCCCTCCC	NNNAATTTTC	TAAAAAATNG	GGGTTCNCNC	ATTTTGNCCC
AAGGNTGGGG	NCNAAAATTN	CNNNNGNNTT	TAGGGAATTT	CCCCCTTTG
NCCCNNNCCA	AAGGNNNGGG	GANNAANCGG	NNTTNGGNCC	CNNTTCCCN
GCCNNNAAAN	GGGGTTGNTT	TNAAAAAC		

H-8-N166

ACAGGTGGCT	GATTCCTAAG	TCAGGAAGGA	TGTACACAAA	GTCCCAGAGC
ATAACAAATG	GTCACTCCAG	TGAGCCATCC	TAAAGTCCTC	TCACTTGACT
TTGTGCTGNC	CTAGCTCACA	TAATAGGGGC	TGGACTTTTG	AGAGTGATAA
TGCTAGAAAT	TGCTAGAAAT	ATTTATTTTA	AATGCAAATG	GCNTAGTGAC
TAGCTAGGGG	GGAATAGAAT	TTTGATTGAT	GGCATCATTG	GGTAGCCAC
ATGTTACCTT	ATGCCTTCAA	GGGACCGAC	CTGCCGGTNN	CCACCCTGCG
CCTTGGNCCC	ACNGAAGGTT	NCAGGCTTGA	ATCTNGGNAN	CATGNTTCCA
TCCCCATNTT	GNTAANGTNA	AAGCAANGCT	GGTGNGNCTT	GNAGGNAANT
TTTTTNCCAT	TNGNTTCCAN	GT		

H-8-N172

GTGTCATTTG	TAAGAAAAAT	GCATAAATTA	GGGAAGACGG	GTTTTTTTTG
TTTTTTTTTN	CTTTGAGACA	GAGNCTNGCT	CTGTGCGCNA	GGCTGAAGGG
CAATGGCGCA	ATCTCGGTTN	ACTACANGCT	CCGCTTCCCG	GGTTCATGCT
ATTCTCCTGC	CTAAGCCTCC	CGAGTAGCTT	GGNACTACAG	GAGCCCGTNA
CCATNCCCGG	NTAATTTTTT	NGNGTTTTTG	NTAAAAAACG	GGGNTTTCAC
CATGTTAGCC	AGGATGGCTC	NANTCCTGAC	TTTGGNATCC	GCCNCTTGG
CCTCCCAAAG	TNCTGGAATA	CAGGCCTTAA	GCAACGGCCC	CGGCCGGAAG
CTNATTTTCN	CTCCCAAAAA	GATTTANGCC	CCTTGAAAAT	TAAANTTTTT

NTGTAAAAAA CCCCCNA

H-8-N173

AAACGATTCT	TAAGGGAATC	TTCTCGCTGA	GCGGNTGCTC	TGGGCCAGGA
GATTGCCACC	GCCAGCCCAC	GGAACCCAGA	ATTTGGGCTC	TNGCCTTGAG
CGGACCGCCT	GTGNCTTCN	GGGCCGATCC	CNCGATCAGA	AGCTTCAAG
TTGGAATCGT	TTTCCCGGNC	CTCGGAGGTG	GATNGCAGAT	CACCNAGAGN
GGNTTTACCA	GTACCNANTA	CAGAATCTAC	CCGGGNTTTT	AACAAGCGCT
CATTTCTAGT	CCCTTGNCCT	TAGAAAANTT	CGCGCTGCCT	TTGANNATAT
CGANTTTTTA	NGNGCAAGTT	TTNGGGGACC		

H-8-L201

GTAGGGAGGT	GTAGGGCAGG	GGAGTGCTAT	GGAAC TTCAA	ATGGGC AAAA
CCGAAAGTAC	TATGGCTGAT	TGCAGCTGTA	ACAGGTCTTT	CGGAGATACG
TAAAATCCTT	TAAAACAGTC	GACTGNCTCC	CTTTATGCAT	AAAAATTTTT
TCTAATCTAC	TGGGTGCTCA	GGAAAGGATC	ACGGGAAAGA	GGCCATTATT
AAATAAAAAA	GCAGAAATTA	TACCAATGTN	GACTTTGGAT	TNTCAAATNN
NTCCAGCCC	TACCTGCTGC	AAGACAAGAN	GCGCGGCTTN	CGGTTCCAAA
CCGAAAGGCA	TANNATTCNG	ACNGGAGGCN	GNAACTGTTN	NAGGTTTCTA
NGCTNCNTAC	CAGACCANNT	ATCCTGACNG	GNGNNGGATT	TCCACATCGG
ANTCCNTTNC	TTAAGGTCGG	GGGCCANAAA	AAACGGGCCC	CCANAGTCCC
TTGGNACGNT	TTNCCNNGGT	TTNGGGCNNG	NTTTAT	

H-8-L204

GTAGCAAAGA	TAGAATGGTG	GGTACCCAAG	GCTAGGAGTG	TTAGGAAGAT
TGGGGAGATG	ATGGCCAAA	GGCACAAAGC	CTCAATTAGA	CAGGAGGAGT
AAGTTTGGGG	AGTTTTTTTC	TACTTTAGAT	ATACTCGCAG	CAGACAAGAC
GCGCGGCTTC	GGTTCCAAAC	CGAAAGCAAA	ANTTCAGACG	GAGGCTTGGA
ACTGTTTTAG	GTTCTCGTCT	CCTACCAGAA	CCACATATCC	TGACGGGGTC
GGATTCCACA	TCGACTCCCT	TCCTCAGNTC	GNNCCACAAA	AACGGCCNCC
ANAGTCNCTG	GGACCGTCTT	CCAGGNTTGC	CGGACGCGTG	TTNAAGACTC
GAAAGTTCCA	CCACGGGTNN	TCACTAGTGA	ATTCGCGGCC	GCTTGCAGGT
CGACCATATG	GGAAAGCTCC	AACGCGTTGG	ATGCATACTT	GAGTATCTAT
AGTGTCACCT	AAATAGTTG			

H-8-L205

ATACAAGGCA	GTTACTCAGT	TCCCGGGCAC	ATTTCAACTT	TTAGAGAACA
ATTACACCAA	TTAAGAAAAT	CGATTACAGC	TAGGCTACTG	ATTCGAGAGC
TAAGTGGCGC	TCATCTTTGG	GAGTATGCCG	TTCAATTCTT	CAAAC TCAA
ATTATTTTAT	CGATTTCTAC	AGTTACCCGC	GGTGC ACTTG	GCTCAAAAAA
AGGGTTCATT	AATTGAGTGC	TTTTTACTCC	CAGCTAAGCT	GACCAAAGAT
CACGGTAAGA	GGCAAAGGGT	CACAGCCGCA	CTGGCGTAAC	CCGTA ACTGT
ACACGTTCCG	GGCGNCCAGG	AGCCAGGCGC	AGACCTNCAA	GCCGGACCAC
TCGAGCTGCT	AAAGAAAAGG	CATACACTAA	CCTTCNGCCG	GAAGAGAAGA
AGGAGCNCCA	GGACGCACGC	TTCTCGGAG		

H-8-L213

GCAGCAAAGA	TAGAATGGTG	GGTACCCAAG	GCTAGGAGTG	TTAGAAGATT
GGGGAGATGA	TGGCCAAAAG	GTACAAAGCC	TCAATTAGAC	AGGAGGAGTA

AGTTTGNNGA	GGTTTTTCT	ACTTTAGATA	TACTGCAGCA	GACAAGACGC
GCGGCTTCGG	TTCCAAACCG	AAAGCAAAAA	TTCAGACGGA	GGCGGGAACT
GTTTTAGGTT	CTCGTCTCCT	ACCAGAACCA	CATATCCTGA	CGGGGTTCGGA
TTCCACATCG	ACTCCCTTCC	TCAGGTCGGC	CACAAAAACG	GCCCCCAAAG
TCCCTTGGGA	CGTCTTCCCA	GGTTTGCNC	CGNNTGTTCA	GAACTCGTCA
GTTCCACCAC	GGTAATCCT	NAGTGGAATT	CCGCGGCCCG	CTTGCAGGTT
CGACCATTAT	GGGANAGCTT	CCCAACGCCG	TTGAATGCAT	AGCTTGNAGT
ATTCTATTGT	GTCACCTAA			

H-8-L214

CAAATATCCT	ATGAATAAAT	CCGTAGTCCC	TTGCTCCTGA	TCTGGCTGAC
ACTACAGATA	TATCACCCAT	ACACAATATG	ATATGTTTTT	CCCTCTTTTC
TGCTCAATGT	TACCAGAGAG	CCTTCAATGA	TTGGCCTCCA	AATTGAAATA
TAATCTAGTT	TTTGCTATTG	AAGTGGATAA	TCTTTTTGAG	TTTATTCCAA
TCTTTTACTT	TNTTTTCANN	TTNNAAAAA	ATNATNTNTT	TNACCCTCNN
TTGNGCTCNN	NGGTACCANA	TTGNCTTCAA	TGGGGGGGAC	ANAAANNCGC
NGTTNNGNT	ACAAAACCGG	GAGNCAAAGT	T'AAAAANCNG	NNGNGAANNT
NTTTCAAGGG	TTNNGGNTTT	NAAAAANCC	CAAANNCCGG	GGGGGGGNGG
GNTCNCCAAN	TGGNACNCTT	TTNNTAAGGG	GGGGCCCNAA	AAAANGNGCC
CCNAAAAANC	CCTNGGNTC			

H-8-L227

AGTCTATTCT	TGCTTACTAG	TTAATTACTT	TTATCTTTCC	AATTGATTTT
AAAGGAGACA	AAAGGTATTG	AATAGCCTGA	GACGTGAAGA	ACCAACCCCA
TTTAAAAAGA	AAATTCTGGG	ATAGTAAAGA	CACACAATTC	CTCTGATTAA
AATTGCATTA	CCCATTTTGA	ACACAAAAAG	CAGTTTAGAC	TTTTCCCTGG
CACACCCTAT	AATGAGATTT	GCCTTATGTC	ATGAAAATCA	ACCCTTCTAT
GCCTAATGCA	GCATTTTTGT	TTTGCTGACT	CACCACCAA	ACCAGGTTGG
CACTTGAGAC	AAACCTGCAG	CAGGACAAGA	CGCGCGGNTT	CGGTTCCAAA
CCGAAGCAA	ATTCAGACGG	AGGCGGGAAC	TGCTTAGGTC	TCGTCTCCTA
CCAGAACCAC	ATATCCTGAC	GGNGTCGGAT	TCCACATCGA	CTCC

H-8-L238

AGTGTGATCC	TTTTAAGCAG	AAATCAGAGA	TGTACCGTTG	CTCAAAGGCC
TCCAGTTGCT	TCCTGCAACC	ATCAGAATAA	TACCTGAATC	CCTTACTGCA
CTCCACTTAC	TTTAAGACCC	TACATGATCT	GGCTTCTGTT	TCCTGCTTAT
ATCCTCTACT	TTATTTANNA	TTGATTTAAT	TAAATGANNT	TTTTGAGACA
AGNCTTGCTC	TGTCGCNCAN	GCTGNAGTGC	AGAGGTGCAA	TCNCAGCTTA
ATGGTACCTC	AGCCACCAGG	GGTACCANGC	AGTTATCCCN	GCCTCAGCCT
CCTGAGGNAC	CTGCNAAACA	NTCCTGGGTA	AATTTTAGGA	TNTTTTTAGG
NNAGACAGGG	TTTTGCTATC	TTGGCCAGGC	TGGNCTTAAA	NTTCTGGGCT
TAAGGNAACT	NCCCNCTTTG	GCTCCNGAAT	GNCGGGGGAT	TC

H-8-L244

GTTATAACAA	TTCCACTGCT	GNTTATGCCA	GTGGCTTTAT	TTCACATGGT
AGTTTCTCAG	TTGNAGAAGC	AGNTCGAAGT	CATTTNGAGC	TCCTTTAAAC
TCAACGCTTT	ATAAAGCGNT	GATTACTNTC	GTNTCCACAA	TTAAGATGNC
TCACCANACT	TCTCTTGCA	CACGGGCTGG	GAAAGTCCAA	AAGCCTTAAT
GNCCTGATGC	TATGATTACT	CACTGNGGAG	ACGCTATTCG	GAAGTCAGCT
AGAGCTCCTT	NNAACTCANC	GCTTACTTAC	TGCGGAACCT	TACCTTTCGN

GTTCCGAANT	CAAATTAGCC	NGCANCAGGT	NTTTTGGCAA	TCNNNGTTTG
AAAGGNAACC	AGCCTTAAGC	CTNTNGGTNC	TNAAAANAANG	GCTNAATGNG
CATNANTAAC	TTTTNGCNAT	TCCCAANTTG	CCCATNAACT	TTANAACCCA
NGGGACCTTT	CNAGGGNA			

H-8-L255

TGGAGGGGCA	TAGTGGGAAG	GGCCTTGGAG	GGTGAATAGG	AGTCTCAAAG
GCACTTGACA	TGGGGGCAAG	GAGCTAGATG	AGAGGAAAGG	GTTGCAGGCG
GACCAATGTA	GTCTATGCTC	TGGGCAGTGG	GAGAGACCAG	TAGGTTGGAT
AAATGTCTGG	AAAGGAGGCA	AGGAGAGCAG	AATGGNGTTT	GAGACAGGAA
AGGCATGGAA	TGTCAGGCTA	AGTCTAGGAT	TGACCTCTTT	CTTAGGTGCT
GGGGTGCCTT	TAAGAGGCAG	ATCACTCTGC	AGCAGACAAG	ACGCGCGGNT
TCGGTTCCAA	ACCGAAAGCA	AAAATTCAGA	CGGAGGCNGN	AACCGTTTTA
GGTTCTCGTC	TCCTACCAGA	ACCACATATC	CTGACGNNTT	CGGATTCCAC
ATCGACTCCC	TTCTCAGGT	CGGGCCACAN	AACTGCCCCC	AAAAGTCCTT
GGGANGTCTC				

H-8-Q262

GCTTGACCCA	GGAGAGGGAG	GTTGCAGTGA	GCCGAGACGT	GCCACTGCNC
TCCAGCCTTG	GTGACAGTGA	GACTTCGTCT	CAAAACAAAA	CAAAACAAAA
AACTTCCTCC	CCTGCTAAGT	CCCAAAGCC	AGGGCTTGAG	GGAGGCAAGG
GGCCTCCAGG	AAGGGGNTCC	AGACACCCGT	TAGGNCTTAA	GAATGGGCAC
CCACTTTGGT	TCTGGGAATA	CACCANTGCC	AAATCAGGCT	CNTTGCAGAC
AGCANGTGGN	ACTTGNCAAG	GCTTGTTAGC	CGAAANAAAG	TTTTGGCTTT
GACTTTGTCC	ATTTTAAGNA	ATTNCAGCAN	ACAGGNACNC	CCNTTTTNGG
GTTCAAAACN	GGANGGCAAA	TTTTTTAGAC	TGNNGGTNGA	AACTNTTTTT
AGGTTNNTNG	GTTTTNTNAC	CAANANCCAA	TTTTCTT	

H-8-Q264

CCTTCTTTTT	TTCCTTCCTT	CCTTCCTTCT	TTCCTTCCTT	CCTTCCTTTT
CTTTTTTTCT	TTTTTTTTCTG	ACAGGGTGTC	CTCTGTCACC	CAAGCTGGAA
TGCAGTGGTG	CATTCATAGG	GTCACCTGCA	GCAGACAAGA	CGCGCGTTTT
CGGTTCCAAA	CCGAAGCAAA	AATTCAGACG	GAGGCCGCAG	CTGTTTNAAG
GTCTGGCTTC	TTACCAGAAC	CACATATCTG	GACGGGNNCG	GATTCCAAAT
GGANTCCTTT	TCTNAAGTNG	GGCCANAAA	AACGGCCCCA	AAAGNCCTTN
GGAACNTTTC	CAAAGTTTNG	GGCCNGGTTT	NCAAAAACCTT	GGAAAGTTCC
NNCCAGGGGG	AAANCCNTTA	GGGNAATCCG	GGGCCCNTTT	TNGNGGNNGG
ACCATTTTGG	GAAACNCCCC	AAACCGGG		

H-8-Q269

TTCCCCCCTT	TTTCTGGAGA	CTAAATAAAA	TCTTTTATTT	TATCGATTCA
AGCCACTATG	CGCACAGCTG	GTGCACCACT	GTGCTGGCGA	ATTCTACGT
ACCACCACAC	TGGGATCCGG	CCGGCGCCTA	GAGAAGGAGT	GAGGGCTGGA
TAAAGGGAGG	ATCGAGGCGG	GGTCGAACGA	GGAGGTTCAA	GGGGGAGAGA
CGGGGCGGAT	GGAGGAAGAG	GAGGCGGAGG	CTTAGGGTGT	ACAAAGGGCT
TGACCCAGGG	AGGGGGGTCA	AAAGCCAAGG	CTTCCCAGGT	CACGATGTAG
GGGACCTGGT	CTGGGTGTCC	ATGCGGNCCA	GGTGAAAAGA	CCTTGACTTA
ACCTGGGTGA	TNAGGCTCGG	TTAAAGGTCC	CGTCTCGCGG	CATCCACGTT
AAAGGTTGCC	ATTCTGCAGA	CAAAGGTAAC	CCAACGT	

H-8-Q272

AGTTCAGACA	ATCCTGTAAG	AAGCAATAGA	AGACTATGTT	TTAAGACAAC
TTTAAAAGCT	GCAATTTTTA	GCAGCTTTAA	AATTTAAAGA	TTTTAAACAT
GAAAATAAGA	TTTAAAAACA	TGAAAATAAA	CTGCATCCTG	GTATATATTA
ATTGACTATT	ATAGAATTAA	CACCTCCAT	GTAAAGAGA	CAGCAAAGAC
TGGTACCCAG	CACACCAAAG	AAGTACAAAG	GAAGAAAAAT	CACTACACTG
CAGCAGACAA	GACGCGCGGT	TTCGGTTCCA	AACCGAAAGC	AAAAATTTCAG
ACGGAGGCGG	NAACTGTTTT	AGGGTTCTCG	TCTCCTACCA	GACCACATAT
CCTGACGGGG	NCGGATTCCA	CATCGCTCCT	TNCTCAGGCG	GCCCAAAAAC
GGCCCAAGGN	CCTGGGACGT	CTCCAGGGTT	GCGGC	

H-8-Q275

CTATGAGGTT	GACAAGTGTT	TCTTAGCGTC	CTGATGCACT	CTTGTGGGAG
AACAGCTCTG	TCCTGGCCTC	TGCGTGTGTG	CANCCAGGT	CACATGGGCT
GGGTTTGAAA	CACAGCTGGC	CTGAATCTTG	GCTGGGATGT	CTTGGGGTCC
TCCTGGACCA	TGAGAACTTG	GGGGCTTGT	GAGGAGCTGC	GACAAGACTG
TTTCTCATTG	GCTTCCCTCT	CTACCAAGGA	GGTTGTCATG	AGACCCTGGA
TGTCTGGTTT	CTCCAGATT	CAGAGGAGGT	ATGAGACTTT	CTGCCTGGCT
CCCCACCCCT	TGGGGTATAG	CCAGAGGACC	TGAAACCTTT	TAGCTGCAGA
GACAAGACGC	GCGGTTTCGGT	TCCAAACCGA	AAGCAAAAAT	TCAGACGGAG
CCGGAAGTGT	TTAAGGTCTC	GCTCC		

H-8-Q289

TTGGACTGTC	TACAAATAGA	AAATGAACAC	GTCAAAGGTT	TTATTTTATT
CACCAATTA	TGGAGGAAAC	CCTAAAGGTG	TTAAACTGGG	TTCAAAGGAG
AATTCAAAGG	ACCAGACGCC	TATGTAGGCA	ATCAGAAAAT	GCCCAGCAAT
GAGGAAATGC	ATTTGTTAAT	AGATGCAAGA	CTGGTTTTCT	CCACCAAACA
TTCATTTGCA	TTGACTGTGG	ATGAGAATCA	TTTACATTAC	TATGGGTTTT
TTTTTTTTTN	NAATTTNCCG	GGGTTTNA	ANGCTNAAAN	NCNGNNAAG
GGCNNAAATT	NTTTTNAACT	TTAAGGCCCC	CANTT	

H-8-Q290

GNTTNAGCGC	CGGNGAGCGN	CAGATACGCT	GTNAGCCNNT	GCTCNTNCCN
CTAGCACANA	CAACNTGCTC	NGACGCNCNN	AGGGCTNNGA	GTTCAGNTNT
NAANNCANAA	TTCGGANAAC	TTGCCTANCT	CTNNNNACAN	TCAAGANNAT
GCCTAGATGC	TCTAAGGCTT	GCATAGGGTN	CNCTCAAATA	CNAGGGGNNC
TNGGCACTCC	CCATTGGGGN	CGCTAAATNT	CTGTNNGCAC	CCCNNAATTTN
GGNATNTGGG	CTNACAACNA	NTGTCTGNCA	AAAAGGCAGG	GGTTTCNAAN
ACTGTTTNN	AGCTTNAAGG	NNNAANNTTG	GCCAAANTTT	GGNNNNNNNN
CACNNGGNGC	NTAAAAAGTT	CCCAGNNCNG	NAANGCCNNT	AATTCNNGG
GTANNTTNTG	GNAACTAAT	NAANAGCCTN	TATNCCCCTT	NNTTNCAANC
C				

H-24-Q292

CTCTCTTGAG	GTGACTGACT	TTCTAATAC	GCTCTTCAGN	GAAAAACGTT
TCAATGTCGC	TTGTCTTATT	TCAGCAAAGA	ACTGANNCTG	GAGGGGTTTG
GGAGGAATCC	AGCTAGTTAT	AAAACAGGTC	GTAGTCAACA	AAGCAGGACA
ATCTCCTTGC	AAAAGATTCA	GGGAATTAGG	AGAAAGNAAA	AAGATTGGCT
GAGAGAAGCC	TCTCAGTGTG	GCCACTTAAG	GAGCAATCCC	CTCTTTNTGT
TGTACAGACT	AGTTGGNTAG	TGCAGGCTAC	ATCCTGNNTT	CTGGCTCTAA

CAGGAAGACA	CAATTATATA	TGCCAGCCAN	CCAATNTATC	ACAGGTCCCA
CAGACCTTTG	GATTCCTAAA	GGGGNTTNA	AC	

H-8-C319

AACCTAATTC	ATTGCTGTTA	ATTGCTGTTA	AATTCAGAAC	AGAGAACTTT
AGAATTTTAA	ATTTTCATGT	CCTTTTGCAA	CTTCTTAAGA	GCCACCTTAA
AAAAAATCTC	TTTTATGTGC	TCAGGCAAAA	GAGGGCAGGT	NGTGAGTGGT
GAAAGTGGAT	GAGCCACAGG	CCTCAGGGAA	AGGGGGCCTG	CTGGCCAGAC
GGACCAGGTT	GGCTGAGCTG	TGCAGGGAAG	CGAGTGAACA	CCTGCTTATA
TTAAGCCTTT	TAATTGAGGA	CAAAGGCATC	GGTTGTGCCC	TGAGAACACG
GGCCACAGTT	CAGACGCCCC	CTGCTTGACG	CNGACANGAC	GCGCGGTTCG
GTTCCAAACC	GANGCAAANT	TCAGACGGAG	CCGGAAACTG	TNTAAGGGTC
TNGGCNCCTA	CNANANCCCA	TATCCTGACG	GGGCC	

H-8-C327

GTCAGGCCTG	ACTCCAATAT	GTGTAGTTAA	GAAAGCTTCT	GTTTTCTGT
CTTTAAAATG	AGGAAAATAC	AATATTTCTT	GGGGTAGCAG	TAAAGATTAA
ATGAATTCCCT	ATAAGGCACT	TAGAACAGTG	CTTCACAGGT	AATAAATGCT
TAATAAACAT	TAGTTGTTGT	TACTACTGTT	GCTACTAACA	TTATGTCATC
TATTGCATTT	AAAGATGCCA	GGATTGGCCA	GGCATGGTGG	CTCATACTG
TAATACCAGC	ACTTTGGGCG	NCTGAGGCAG	GAAGATCCTT	GAGTCCAGGA
GTTCAAGACC	AGCCTAGGCN	ACATAATGAG	ACCCCATCTC	TACAAANAAT
ACAAATNAGC	CNGGCATGGC	GGTGCATGCC	AATNGTCCAG	CTACCTTGTG
GGGCTNAGNC	AGNAAGNNTC	GNCTTGAGCC	TGGGAGGTTG	

H-8-C342

GTAATAAACT	GCAGCAGAAA	AACGCGCGGN	TTCGGTTCCA	AACCGAAAGC
AAAAATTCAG	ACGGAGGCGG	GAACTGTTTT	AGGTTCTCGT	CTCCTACCAG
AACCACATAT	CCTGACGGGG	TCGGATTCCA	CATCGACTCC	CTTCCTCAGG
TCGGGCCACA	AAAACGGCCC	CCAAAGTCCC	TGGGACGTCT	CCCAGGNTTG
CGGCCGGGTG	TTCAGAACTC	GTCAGTTCCA	CCACGGGTAA	TCACTAGTGA
ATTTCGCGCC	NCNTGCAGGT	CGACCATATG	GGAGAGCTCC	CAACGCGTTG
GATGCATAGC	TTGAGTATTC	TATAGTGCAC	CTAAATAGCT	TGCGTAATCA
TGGTCATAGC	TGTTCTGTG	TGAAATTGTT	ATCCGCT	

H-8-F381

GGCTTATCTT	TCATTAACGA	AATTGTAGAT	GTTTTACATT	TCAGTATTTT
TGAAATTTTA	AAATAGAAAT	TTGCATGTAA	GTCCGAAATG	ACAAATGGAT
AGGCCAGCAC	CTTCTTAGCA	GGGCTACTGG	AAGGCAATTC	TGAATACTGA
AATATTGGAG	GCAATTCTGT	TAGATTCTTC	TATCCGATGT	TCCAGTTTCC
TCTGAGGAGG	CCCCCTGTGC	TCTACCCTGC	TAATGCTCAA	GTTCCTATAG
GTGTGACCCC	ACTGCAGCAG	ACAAGACGCG	CGGGNTTCGG	TTCCAAACCG
AANGCAAAAN	TTCAGACGGA	GGCGGAAACT	GTTTTAGGTT	CTNGTCTCCT
ACCAGAACCA	NATNTCCTGA	CGGGTCGNAT	CCCACATCGA	CTCCTTCTTA
AGGGCGGGCC	CCAAANACNG	CCCCAAAGTC	CCTGGACGNG	TCCCAGGTTG
CGGCCGGNTT	NCAAACCG			

H-8-F386

CTTCTTAATC	CCAGCTTCCT	ATCACAACCC	AGGAATATTA	AAGACAATTA
GATGGTTTTA	GTTTGGCAAT	GGATAATTAT	AATCATGTCA	TTTTAGCAAG

CTTCTCCTGT	GACCACTTGA	CCCTATTTTT	TTGTTTTTTG	AGACAGGGTC
TTGCTCTGTT	GTCCAGGCTG	CAGCAGGACA	AGACGCGCGG	TTTCNGGTTC
CAAACCGAAG	CANNAATTCA	GACGGAGGCG	GGACTGTTTT	AGGTTCTCGC
TCCTACCAGA	ACCACNTATC	CTGACGGGGT	CCGGATTCCA	CATCGACTCC
CTTCCTCAGG	TCGGGCCNCC	AAAAACCGGC	CCCCAAAGTC	CCTTGGGNNN
GTCTCCAAGG	GTTNGCCGGC	CGGTTTNTTC	AANAACTCGN	NAGTCCNCCC
CGGGTNAATC	NCTNGNGAAT	TCGCGNNCCC	TGCCNGGTTCG	NCCATTTTGG
AAAGCTCCNA	CNCAG			

H-8-F393

TAATGACCAA	AAACACAGCA	CCACTTTTCT	CATTTTCCTTC	TTTAAAACTT
TTTTGTTGTT	TCTGTATCTA	AGTGATTTAT	CCCCCTCCCT	GAATTTATAC
CAACTCCCTG	AATGTTTCCT	TTCACCTAGC	ATATTCGCTG	AGGTAGCTCG
TACTTTGTAT	TATTTGCTTC	AAGGAAAAGA	GAAAATACCT	CAGTGTCCCA
GANACTCTTG	TATGTGTTGC	ACTAAAAAGA	TCTGGAACAC	CTGAGTGGTC
TAATGTCTNA	TGGTGNTGGG	TTATCATGAA	CTTATTAACA	TTAGTGTTCG
CAGGGTGCAG	TGCACAAGCC	TGTAANCCCA	GCACTTTGGG	AGGCCAAGGC
ANGAGGATTN	GTTGAGCTCA	GGNNTCGAGC	TAGCCTGGNC	NTNTAGCACC
AGGANCTNTA	GNAAAAATAT	GAAATTNNCC	AGCNGG	

H-8-F407

AAGGTAGCCC	ATCTCTTGAG	CCAGGCGCTG	TCCTAAGCTC	CTGACATCCC
CACAGACCTG	AGAAAGGGGC	ACCACAAACA	GGAACCAGGC	TGAGACTNGA
GCCTGTGGAC	CCTGGTAGCA	AGGGCGCCCT	CTCTCTAAGA	AGCCCTCTGT
CATGCTACCG	ATGTTGCAGA	ACACCTGGNG	CTGGAGTAGG	GAGTGCCAAA
GCGCAGGNGA	TGAGTGCACA	GAAGGGAGAC	TTCTATGGTC	TGCAGCAGAC
AAGACGCGCG	GTTTCGGTTC	AAACCGAAAG	CAAAAATTCA	GACGGAGNNG
GNAACTGTTT	TAGGGTTCTN	GTCTCCTACC	AGAACCATA	TCCTGACGGG
TCGGANTCCA	CATCGACTCC	CTTTCCTCAA	GGTCGGGCTN	NNAAAAACGG
CCNCNANGTC	CTTGGNACGT	CTCCAAGGG	TTTGCACCGG	

H-8-F409

ATGATAGCCC	AAGTAAAAAT	TTCAGTACAT	ACTAGGGAAG	ACAGTAAAAG
GACACTGCCA	GAGATTGACC	TAGAGAGAGG	GAGATGGAAC	ATGGGAGAGA
AAAAATAAGG	TTAGAGGCTT	ATCAGGCAGT	TGAACATTCA	ACTTACAGAA
GTTTCAGAAAG	GAGAGCAGAG	CACAGTGAGG	NCAGAAAATT	ATCAAGTAGC
TTAAGAACAT	GTAGAACTAA	AGAACATGAG	TCCTAGTACA	GTGAATGAAA
AATGATTAC	CCCAAGACTC	GTCATTTCCA	AAATTTTGTG	ANGTGAGAGA
TATNNNANNC	AGCTCATATA	CNGAGAATTA	GGAATCAAAN	TGACAGTGGA
CTTNGAAGTT	NATGGAGCNT	TCCTTCAAAA	TTTTNAGGCC	GNANNCTTTG
CTTCTTATTC	GTATTTAACT	TAACTGTAA	CCATTGG	

H-8-F425

CCATCTGAGG	GGCTTGGGGT	CCTGCAGCTN	GCGAGGANAA	GACGCGCGGT
TTCGGTTCCA	AACCGAAGCA	AAAATTCAGA	CGGAGGCGGG	GAAGTGTTTT
AGGTTCTCGG	TCTCCTACCA	GACCACATAT	CCTGACGGGG	TCGGATTCCA
CATCGGACTC	CCTTCCTCAG	GTCGGGCCAC	AAAAACGGCC	CCCAAAGTCC
CTGGGACGTC	TCCCAGGGTT	GCGGCCGGGT	GTTTCAGGAAC	TCGTCAAGTT
CACCACGGTA	ATCNGAATTC	NNCGCCGGA	ATGGCGGC	

H-8-K441

GGGTGGTAGG	GCATNNGTTA	NNCTGTNGCA	GAGCCAGAAA	ATAAGCAGGG
TTNNGNACTA	NNGCGNAAAT	TAATGGAATT	GCTAAAGTCC	ANGTGTAGNG
CAAGCGCTGT	GAGTATATGA	ATCCTTTGGN	NNCTCGCGCG	CGAGACAAGC
ACGCGCGGGT	TTCGGGTTC	AAACCGAANG	CCNAANNTTN	AGACGGGGGG
NGGGACNCTG	TTTTAGGGCT	CCNGTCNTAT	ANCANNACCC	ATANNTTCTG
GGAGGGCTCN	GGNTTNNCAA	ANGGGGNCCC	CNTTTTCAAA	GGGGNNGGCC
AAAAANACNG	GCCCCAAAAG	TCCGTNGGNN	NGTCTCCCAG	GTTTTCCCCC
GGGTTTTCAA	AAATTTGGAG	GTTCCCCCN	GGGGGNNNC	CCNNTGAAA
TTCCGGGGCC	CCCTTGGNGG			

H-8-K442

CTCTTGATTC	NTTTCTTCTC	GAGCTCGTGA	ATGTTACCCT	AGTAGNGGC
TGCAGAGCAN	AAGACGCGCG	GTNTCTGGTT	CCAAACCGAA	AGCAAAAATT
CAGACGGAGN	CGGGGAACTC	GTTTTAGAGT	TCTCTGTCTC	CTACCAGAAC
CACATATCCT	GACAGGGGTC	NGGATTCCAC	ATCGACTCCC	TTNCTCAGGT
NGGGGCCACA	AAAACNGCCC	CCAAATCCCT	NGGANGTCTN	CCAGGGTTTG
CNGCCGGTTN	TTCAGAACTT	NGGCAGNTNC	CCACGGGGNN	ATCCTAGGGG
ANTCCGGGCC	CCTTCAGGTC	GACCATTTTG	GGAAACCTCC	CAACGCGTTT
GGATGCATA				

H-8-K444

AGNAGGCATA	AGGACCTATG	TTACTCAGAG	GGTTTGA	CATTTATTAA
TTGTGAGAGG	AACATGGGAA	AATGATCTAA	TTCACGCTAT	CTTCTTCCT
TATTCTCGGA	AACCTATTTG	TTTATTCTTT	TGTTTTTGT	GTCAGGGTCA
GCAGTTCATG	GGTAAAGACG	GGAGCGCAAG	GATGAAAATG	TGAGTGTGCA
TTATACATAT	TCCAGCAGGG	TTGACCTGTG	GGAGCAAAT	GGCTTTNCCG
NGTCCTTTGC	TCATGCACTG	TCCGTGNCTC	CTATTGGNAC	GAGGAAGAGA
AGACATCAGC	CTAGGNACCA	TNTGGNNCCN	GNGGCCTGAT	NGTGNAGTGT
GAAAAGNGTG	GT			

H-8-K452

ACGCCTNCCT	CCAGCCTCGG	GGTAACAGAG	CGCGACTNCA	TCTCAAAAAN
AAAGAGAAAA	AGCNTGTNGT	GGNCTCTCT	TTACACAGAA	CNNGCGTGNA
CACACANGGC	TCGCTCTCGA	GAAANTCCAT	AGAGATTATA	TAGAATGTTG
GGGTCGCCTG	GTACANAAGA	NCTAGGCATA	CNNGNAGCCA	TTNACNAAAT
GGNGGCTTAN	ANNACTCTAN	ACTTCTCCA	AGGNCCAGGG	CACATANCCT
CCTNCTCCAT	AAAAACTTCC	TTCTNAGNNC	ANAGGCANGG	TTGAGNTCCC
TNANANTGTG	GGGGGTCCTT	CTGCAANTTT	TNTTTTTTTN	GNGAACGGTT
TTTAA				

H-8-K481

GGTTCAAGCA	ACNATTCTGC	NTCAGCATCC	CGAGTANCTG	GGACTACAGG
AGCNCGNACC	ACACCCAGCT	AATTTTTGTA	NTTTTAGTNG	TAGATGGGGT
TTCACCATGT	TGGCCACGNG	NGATCTCGAT	CTCTTGACCT	CATGATCCGC
CCACCTTGNC	CNCCCAAAGT	GCTGGGANTA	CAGGCATGAG	CCAACATGCN
CAGNCTCATC	CTNTCCTTTT	TAATGGTATA	TGGGTCTTAT	GTCAGAAAGT
TGTTTTANCN	AANGGTCACN	AGATTATTAA	TCCNCNTGN	GGGTTNCCCC
TCTTGNCNCN	CNNNTTCCCN	GGGAGNANNT	CTTTCTTCCA	GTTT

H-8-E500

AGGGCNTCTG	GAGTCCCAAG	GAAGCAGAGA	CCACAGCTTG	NAGAGAATCC
GGGATCCTCG	AGTCACTCAA	TCAGGAAGAC	CCACCATGTA	ACCCTGGGAC
TGTCTGTTAC	GGCACCGGGG	GTNGCNTNAC	NTGACTAATG	CAANCTNGAC
TTTATAAATN	CTGGTGNCTC	CAAGCAGAAC	AANCAGGNGC	TGNTTTCGGG
TTCNAAAACC	NAANGCAAAA	TTTTTTCGNAC	GGGAGCGAAN	NNNANTTGT
TTGTAGGGNT	TNTGGGNTTT	CNNNACTNNA	GATCGCNTAT	TTTCCCTNGA
GGGNGNTNNA	TTTTNNAAAA	TGAAACTCNN	TTTTTG	

H-8-E504

TGGGTCTTTT	AGATGGAGTG	NCCAGGGTGN	ATCTCACAGG	CCCAGAAGGT
TCCCATGNAG	GAGAAGAGCT	CTGTGTAGCC	TGCCTATCCC	CTCCAGGCCA
GCAGGAACAT	CTTGTCACTT	TGATTGCTGT	GGTCAACTCA	AACCCCACT
CCTGGAGCCT	GCCCTGGCTT	ATATGCTAAG	CACAAAGGCC	AATGTTTACT
AACTCAAGGA	AGTGTGTCAA	CAGCAGTGGG	TTGCAAAGGC	TGGCAGGCAT
CTAGAGGTAG	GAActCTGTC	CCCAACACTG	TAGGTCTCAG	TCCCATGCTG
AGTGCACCCC	TAGATGCCAT	TCACATGTCT	GGGCAGAGAG	CAGGGAGCAA
GCCTGCAGCA	AGACAAGACG	CGCGGCTTCG	GTTCCAAACC	GAAAGCAAAA
TTCAGACGGA	GGNNTGACTG	TTTAGGGTCT	CGTNTCTACC	GACNCTTCC
TACCGGGTCC	GATTCCANAT	CGCTCCNNTC	TCAGGNCGGG	CCAAG

H-8-E508

ACCTGAACCA	GCACGTCAT	GATGGCCTCC	AGAGGCCGGT	TGTTGTCCAG
TGCGCGGCTT	AGCTTCAGCT	CACCCGTGGA	GGCATTGGAG	CAGGACCAGG
CTGAGTTCAT	TTCCCCGCTC	AAAGCTGTAA	GTCAGACTAT	CTGAGATATC
AGGGTCATGG	GCAGGTACTC	GGCCAATGGC	ACCCCCAGGG	AAGCTGCTTG
AGCGATTGGT	TGACATAGTT	GTTGAAAAGG	ACTCAAAGTT	GCCCAGCACT
GGTGGGTTGT	CATTGCGGTC	AAGGAGGCGG	ACGTGGACTG	TAGCCNGCTC
ACCAGAGNAG	CTGACGTGGC	CTGGATGACC	AGGACGTACT	CAGGCCGGTC
CTCGTAGTCT	AAGTCTACCA	GGNCTGTCAG	CTCCCCNGAG	AAGATGTCCA
GCTTGGAAGA	CCTCAGGGAT	GTTGCCCTCC	ACANTCTGGA	CATAATCTGG
GCATTGGTNC	CTTCATCGGG	GTNAG		

H-8-E542

GTNTAGTAGN	CTATGCTTTT	TGANGGAATT	CAGACTGGGC	CGTCACACAT
TCCCAAATTA	AGGAAAACCT	CTTAACATTT	CGACATCCCC	CAGGAAAATG
CTCGAAAGAA	CAGTGNAGTA	GAAAGCAAAA	AAGGCATAGA	TGATGTGCGA
TGCTGGGGAA	GATGGATCGG	GACCCCTCAG	GGATTGAGTA	GCTCACTCAT
TAAACCTAAG	CCTTACAGAT	CAAAATACTT	TATCAAACCC	TCATGGAAAT
ATTTTANGCA	CGTGCTTTGC	TTGCAGNANG	TCAAAACCAT	AAATGTAAAT
GATCTACGGA	ACGAAGAGTA	TGTGGGTATT	TANCCTGGCA	GTGCATGACA
TGCAGTATTA	GTTTATTGCT	TTGATAAAAT	GGCTTGGTCC	TAAAATTAGG

GST-Id	DNA-Pool	Kategorie	Annotation	Proteinfamilie/Funktion	chromosomale Lokalisation	Integrationsort	Integrationsrichtung	Accession nr.
H-8-M50	9	Gen	ATP-binding cassette, subfamily C, member 2 (ABCC2)	Metabolismus, Ionentransport	10q24.2	Intron 1	antisense	U49248
H-8-M52	9	GenScan	Klon RP11-443B7	unbekannt	1q42.3	5'-upstream	antisense	AL391832
H-8-M53	9	Gen	L-histidine Decarboxylase (HDC)	Metabolismus	15q21.2	Intron 4	antisense	D16583
H-8-M54	9	GenScan	Klon RP11-213C21	unbekannt	15.q14	5'-upstream	sense	AC022841
H-8-M55	9	genomische Sequenz	Klon RP11-9118	unbekannt	18p11.31	-	-	AP005205
H-8-M56	9	Gen	Tyrosin-Phosphatase (P-D38TP4A1)	Signaltransduktion	6q12	5'-upstream	sense	NM_003463
H-8-M57	9	hypothetisches Protein	hyp. Protein Q8N3R3	unbekannt	3p21.33	Intron 3	antisense	AL832473
H-8-M66	9	Gen	EBNA1 binding protein 2 (EBNA1BP)	Nukleinsäure-bindend, rRNA-Prozessierung	1p34.2	Intron 9	sense	NM_006824
H-8-M78	9	repetitive Sequenz	-	-	-	-	-	-
H-8-M85	9	GenScan	Klon RP11-802J22	unbekannt	12q23.3	Intron 1	sense	AC073531
H-8-M91	9	hypothetisches Protein	hyp. Protein FLJ 32000	Zytoskelett/extraz. Matrix, Mikrotubuli-assoziiertes Protein (G-Protein mit WD65 repeats)	1p34.2	Intron 9	antisense	NM_152498
H-8-M105	9	Gen	Thioredoxin-Reduktase 1 (TXNRD1)	Metabolismus	12q23.3	5'-upstream	antisense	AY057105
H-8-N149	10	Gen	Formintransferase, Cyclodeaminase (FTCD)	Metabolismus	21q22.3	Intron 11	antisense	NM_206965
H-8-N152	10	Gen	RhoBTB3	Signaltransduktion, RhoGTPase, Ras-Proteine	5q15	5'-upstream	antisense	NM_014899

H-8-N164	10	Gen	SLIT-RHOB0 Rho GTPase aktivierendes Protein (SRGAP1)	Signaltransduktion, RhoGTPase aktivierendes Protein, Zellmobilität	12q14.2	Intron 1	sense	NM_020762
H-8-N166	10	Gen	Chondroitin beta 1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase (ChGn)	Metabolismus	8p21.3	Intron 1	antisense	NM_018371
H-8-N172	10	GenScan	Klon RP11-69M1	unbekannt	12p13.31	Intron 1	antisense	AC006511
H-8-N173	10	Gen	Chromobox-Homolog 4, Polycomb-Protein (CBX4)	Nukleinsäure-bindend, Polycomb-Protein (Chromatin-assoziiert)	17q25.3	5'-upstream	sense	NM_003655
H-8-L201	8	Gen	Coatomer Protein beta (COPB)	Vesikeltransport, Golgi-ER	11p15.2	5'-upstream	antisense	NM_016451
H-8-L204	8	hypothetisches Protein	FLJ 39235	Signaltransduktion, Homolog zu Fatso-Protein der Maus	16q12.2	Intron 1	sense	AK096554
H-8-L205	8	hypothetisches Protein	FLJ20627	unbekannt	6p25.1	Intron 1	sense	NM_017909
H-8-L213	8	hypothetisches Protein	FLJ12910	unbekannt	6p25.1	5'-upstream	antisense	NM_024573
H-8-L214	8	hypothetisches Protein	FLJ23235	unbekannt	4p14	Intron 1	antisense	NM_024943
H-8-L227	8	Gen	CC3	Metabolismus, kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen	11p15.1	Intron 3	antisense	NM_006410
H-8-L238	8	EST	cDNA FLJ12660f1s	Metabolismus, Sequenzibereinstimmungen zu MRP-Protein	14q12	Intron 10	sense	AK022722
H-8-L244	8	Gen	Kalziumkanal beta 2 Untereinheit (CACNB2b)	Transport, Calcium-Kanal	10p12.31	Intron 2	sense	AF285239
H-8-L255	8	Gen	C1q and tumor necrosis related protein 6 (CIQTNF6)	Zytoskelett/extraz. Matrix, Kollagen	22q13.1	Intron 2	antisense	NM_031910
H-24-Q262	16	Gen	Rest Corepressor 1 (RCOR1)	Nukleinsäure-bindend, Genregulation (neural-spezifisch)	14q32.31	Intron 3	sense	NM_015156

H-24-Q264	16	Gen	Caveolin 1 (CAV-1)	Signaltransduktion, Membranstrukturprotein	7q31.2	5'-upstream	sense	NM_001753
H-24-Q269	16	hypothetisches Protein	LOC339685	Nukleinsäure-bindend, Genregulation	22q13.31	Intron 1	antisense	BC043000
H-24-Q272	16	Gen	Zinkfinger, C'W with coiled coil domain 3 (ZCWC3)	Nukleinsäure-bindend, Zink-Finger Protein	21q22.12	Intron 2	sense	NM_015358
H-24-Q275	16	EST	Fibulin 1 (Isoform D)	Zytoskelett/extraz. Matrix, Glykoprotein	22q13.31	Intron 1	sense	NM_006486
H-24-Q289	16	GenScan	Klon RP11-802122	unbekannt	12q23.3	Intron 1	sense	AC073531
H-24-Q290	16	repetitive Sequenz	-	-	-	-	-	-
H-24-Q292	16	Gen	Arylsulfatase G	Metabolismus	17q24.2	Intron 7	sense	NM_014960
H-8-C319	3	Gen	Phosphatidylinositol 4-Phosphat 5-Kinase (PI-4-P-5kinase I β)	Zytoskelett/extraz. Matrix	9q21.11	Intron 4	sense	NM_003558
H-8-C327	3	hypothetisches Protein	FLJ 11336	unbekannt	11p13	Intron 2	sense	NM_018393
H-8-C342	3	repetitive Sequenz	-	-	-	-	-	-
H-8-F381	6	Gen	ATPase, class I, type 8B, member I (ATP8B1)	Metabolismus, ATPase	18q21.31	Intron 5	antisense	NM_005603
H-8-F386	6	GenScan	Klon RP11-128M1	enthält 3'-Ende einer Variante des STK35 Gens (Serin/Threonin Kinase 35)	20p13	Intron 2	sense	AL121899
H-8-F393	6	Gen	Nuclear valosin-containing Protein like (NVL)	Metabolismus, ATPase	1q42.12	Intron 1	antisense	NM_206840
H-8-F407	6	GenScan	Klon CMB9-22P13	unbekannt	11q13.1	Exon 1	sense	AP000769

H-8-F409	6	hypothetisches Protein	FLJ21877	Signaltransduktion, Membranprotein, interagiert mit Todesrezeptor	2p21	Intron 5	sense	NM_022065
H-8-F425	6	GenScan	gen. DNA chrom. 21q section 95/105	unbekannt	21q22.3	-	antisense	AP001751
H-8-K441	7	Gen	activating transcription factor 1 (ATF-1)	Nukleinsäure-bindend, Transkriptionsfaktor	12q13.12	Intron 2	antisense	NM_005171
H-8-K442	7	GenScan	Klon RP-570H19	unbekannt	9p22.2	Intron 2	antisense	AL442638
H-8-K444	7	genomische Sequenz	Klon RP11-246E12	unbekannt	18q21.1	-	-	AC105101
H-8-K452	7	Gen	Cytidin-Deaminase, (CDA)	Metabolismus	1p36.12	Intron 2	sense	NM_001785
H-8-K481	7	EST	Phosphodiesterase, (PDE43)	Metabolismus	5q11.2	Intron 4	antisense	NM_006203
H-8-E500	5	GenScan	Klon RP 11-680G10	unbekannt	16q24.1	5'-upstream	antisense	AC092377
H-8-E504	5	hypothetisches Protein	K1AA1076	unbekannt	12q24.31	Intron 3	sense	XM_037523
H-8-E508	5	Gen	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 (CELSR2)	Zytoskelett/extraz. Matrix,	1p13.3	Exon 1	antisense	NM_001408
H-8-E542	5	genomische Sequenz	Klon RP11-269C23	unbekannt	13q14.11	-	-	AL138960

Danksagung

Danken möchte ich Prof. Dr. Harald von Melchner für die Bereitstellung und die Betreuung dieses Themas und für die Möglichkeit in der Abteilung der Molekularen Hämatologie eine Doktorarbeit, unter ausgezeichneten Bedingungen, anzufertigen.

Bei Herr Prof. Dr. Theodor Dinger mann bedanke ich mich für die Übernahme der externen Betreuung dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. Joachim Altschmied möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen, weil er mich in jeder Phase der Arbeit sehr kompetent und richtungweisend begleitete und viel Geduld zeigte.

Für die außerordentliche Hilfsbereitschaft danke ich allen Mitarbeitern der Molekularen Hämatologie, insbesondere Frau Doris-Maria Viel.

Der größte und wichtigste Dank gilt allen aktuellen und ehemaligen Labormitgliedern für die vielgestaltige Unterstützung wissenschaftlicher und vor allem nichtwissenschaftlicher Art. Das gilt auch für all diejenigen, die mir außerhalb des Labors zur Seite gestanden haben, vielen Dank.