
Untersuchung hochmolekularer Proteinkomplexe in menschlichen Leukämien mittels Proteomics Werkzeugen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Sabrina Baltruschat
aus Hofheim am Taunus

Frankfurt am Main, 2009
(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. D. Steinhilber

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Karas

2. Gutachter: Prof. Dr. R. Marschalek

Datum der Disputation: 11.11.2009

Für meine Eltern

Nicht Kunst und Wissenschaft allein, Geduld will bei dem Werke sein.

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Leukämie	3
2.1.1 Erkrankungen des hämatopoetischen (blutbildenden) Systems	3
2.1.2 Chromosomale Translokationen als Ursache von Leukämie-Erkrankungen.....	4
2.1.3 Die chromosomale Translokation t(4;11)(q21;q23).....	6
2.1.3.1 <i>Klinisches Erscheinungsbild einer t(4;11) assoziierten Leukämie</i>	<i>7</i>
2.1.3.2 <i>Molekulare Grundlagen</i>	<i>8</i>
2.2 Das MLL-Protein (Struktur und Funktion).....	8
2.2.1 Das <i>MLL</i> -Gen.....	8
2.2.2 Funktionelle Domänen des MLL-Proteins	9
2.2.3 Aufbau des MLL-Multiproteinkomplexes	12
2.2.4 Funktion des MLL-Proteinkomplexes.....	16
2.3 Das AF4-Protein (Struktur und Funktion)	18
2.3.1 Das <i>AF4</i> -Gen.....	18
2.3.2 Funktionelle Domänen des AF4-Proteins	18
2.3.3 Interaktionen des AF4-Proteins/ Aufbau des AF4-Proteinkomplexes.....	19
2.3.4 Funktionen des AF4-Proteinkomplexes	21
2.4 Die Fusionsproteine AF4•MLL (der4) und MLL•AF4 (der11)	24
2.4.1 Das Fusionsprotein MLL•AF4 (der11).....	25
2.4.2 Das Fusionsprotein AF4•MLL (der4).....	27
2.5 Massenspektrometrie zur Analyse von Proteinen	29
2.5.1 Grundlagen der Massenspektrometrie.....	29
2.5.2 MALDI – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation	30
2.5.3 MALDI-TOF (time of flight).....	32
2.5.4 MALDI-TOF-PSD	35
2.5.5 MALDI-TOF/TOF	36
2.5.6 CID – <i>collision induced dissociation</i>	37
2.5.7 Peptidsequenzierung	38
2.5.8 ESI – <i>Elektrospray Ionisation</i>	39
2.5.8.1 <i>Angewandte Massenanalytoren bei ESI</i>	<i>40</i>

2.6 Proteomics	41
2.6.1 Protein-Protein-Interaktion: Proteinkomplexe	42
2.6.1.1 Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse (Yeast Two Hybrid System)	43
2.6.1.2 Isolierung von Proteinkomplexen.....	43
2.6.2 Proteinidentifizierung mittels Western Blot.....	45
2.6.2.1 Das Blotten.....	46
2.6.2.2 Die Immunfärbung.....	47
2.6.3 Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie	48
2.6.3.1 PMF – peptide mass fingerprint.....	48
2.6.3.2 MS/MS-Analyse.....	49
3 Zielsetzung der Arbeit	50
4 Ergebnisse.....	51
4.1 Größenausschlusschromatographie zur Abschätzung der Größe der Multiproteinkomplexe	51
4.2 Isolierung des AF4- und der4-Komplexes.....	52
4.2.1 ...mittels Strep-Tag.....	53
4.2.2 ...mittels Tandem Affinitätsreinigung über Strep- und Flag-Tag	54
4.3 Identifizierung der Komplexpartner von AF4 und der4	56
4.3.1 Western Blot Ergebnisse	56
4.3.2 Tryptischer in-Gel Verdau der Elutionsbanden und anschließende MALDI-TOF Messung	60
4.3.3 Ergebnisse aus den nLC-MALDI-MS/MS-Experimenten	64
4.3.4 Immunopräzipitation zur Verifizierung der neuen Komplexpartner.....	66
4.4 In vitro Histon-Methyltransferase-Assay	69
4.5 Isolierung des ENL-Proteins und Nachweis seiner Interaktionspartner	71
4.5.1 Reinigung von ENL über das Strep-Tag	71
4.5.2 Nachweis von ENL Komplexpartnern	72
4.5.3 Die Interaktion von ENL mit AF4.....	73
4.6 Stabilisiert ENL das AF4-Protein?	74
5 Diskussion.....	77
5.1 Zusammensetzung und Funktion des AF4-Komplexes	77
5.1.1 Die Identifizierung der AF4-Komplexpartner	77
5.1.2 Die Bedeutung der neuen Interaktionspartner für den AF4-Komplex.....	78
5.1.3 Der AF4-Komplex besitzt Methyltransferase-Aktivität	84
5.2 Zusammensetzung und Funktion des der4-Komplexes im Hinblick auf den pathomolekularen Mechanismus der t(4;11)-Translokation	85

5.3 Der ENL-Komplex	88
5.3.1 Die Isolierung des ENL-Komplexes	88
5.3.2 Identifizierte Interaktionspartner des ENL-Proteins.....	88
5.3.3 Die Interaktion zwischen AF4 und ENL.....	89
6 Material und Methoden	90
6.1 Material	90
6.1.1 Biochemica, Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen	90
6.1.2 Pufferlösungen und Medien	94
6.1.3 Synthetische Oligonukleotide.....	98
6.1.3.1 Oligonukleotide für Sequenzierungen.....	98
6.1.3.2 Oligonukleotide für Klonierungen.....	99
6.1.4 Verwendete Organismen	100
6.1.5 Vektoren und Plasmide.....	101
6.1.6 Verwendete Antikörper	102
6.2 Standardmethoden der Molekularbiologie	106
6.3 Transfektion der 293T-Zelllinie nach der PEI-Methode	107
6.4 Methoden zur Proteinreinigung	108
6.4.1 Spezifische Affinitätschromatographie mit Strep-Tactin.....	108
6.4.2 Tandem-Affinitätsreinigung mittels Strep- und Flag-Tag.....	109
6.4.3 Immunopräzipitation.....	110
6.5 Methoden der Proteinbiochemie.....	111
6.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	111
6.5.2 Färbemethoden.....	112
6.5.2.1 Coomassie Blau-Färbung (Standard).....	112
6.5.2.2 Kolloidale Coomassie Färbung nach Neuhoff.....	112
6.5.3 Western Blot	113
6.5.3.1 Proteintransfer.....	113
6.5.3.2 Hybridisierungsbedingungen	113
6.5.4 Antikörperreinigung.....	114
6.5.5 Größenausschlusschromatographie	115
6.5.6 <i>In vitro</i> Histon-Methyltransferase-Assay (HMT)	115
6.6 Massenspektrometrie.....	117
6.6.1 Tryptischer In-Gel-Verdau der Proteine	117
6.6.2 Tryptischer In-Lösung-Verdau.....	118
6.6.3 „Dried droplet“ Präparation	119
6.6.4 MALDI-TOF Messung von Peptiden	119
6.6.5 nLC-MALDI-MS/MS	119
6.6.6 Auswertung und Datenbanksuche	120

7	Literaturverzeichnis	121
8	Abkürzungsverzeichnis	137
9	Anhang.....	141
9.1	Ergebniss-Listen der nLC-MALDI-MS/MS-Läufe	141
9.2	Lebenslauf.....	152
9.3	Publikationen, Vorträge und Präsentationen	153
9.4	Danksagung	154

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Krebs bei Kindern (ermittelt aus den Jahren 1997 – 2006)	4
Abbildung 2-2:	Zytogenetische Subgruppen der ALL. Inzidenz verschiedener zytogenetischer Veränderungen bei Kleinkindern	4
Abbildung 2-3:	Verteilung von verschiedenen Translokationspartnern des MLL bei Kindern und Erwachsenen mit ALL und AML	6
Abbildung 2-4:	Schematische Darstellung des MLL-Proteins mit seinen funktionellen Domänen	10
Abbildung 2-5:	Schematische Darstellung der Bildung des MLL-Multiproteinkomplexes.....	15
Abbildung 2-6:	Schematische Darstellung des AF4-Proteins und seiner funktionellen Domänen	19
Abbildung 2-7:	Zusammensetzung des AF4-Proteinkomplexes.....	21
Abbildung 2-8:	Modell der durch AF4 stimulierten transkriptionellen Elongation der RNA-Pol II und die resultierende vermittelte Umformung der Chromatinstruktur in eine offene Konformation (aus Bitoun et al., 2007).....	23
Abbildung 2-9:	Schematische Darstellung des der11-Fusionsproteins mit den funktionellen Domänen	25
Abbildung 2-10:	Schematische Darstellung des pathologischen Mechanismus des der4-Fusionsproteins	28
Abbildung 2-11:	Komponenten eines Massenspektrometers	30
Abbildung 2-12:	Schematische Darstellung eines linearen Flugzeitmassenspektrometers	33
Abbildung 2-13:	Das Auflösungsvermögen R	34
Abbildung 2-14:	Schematische Darstellung eines MALDI-TOF-Massenspektrometers mit Reflektor.....	34
Abbildung 2-15:	Schematische Darstellung des Prinzips von MALDI-TOF-PSD	36
Abbildung 2-16:	Schematische Darstellung eines MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometers.....	37
Abbildung 2-17:	Fragmentierungs-Schema von Peptiden	38
Abbildung 2-18:	Schematische Darstellung der Strep-Tag-Reinigung mit anschließender Analyse der gefundenen Interaktionspartner mittels Western Blot bzw. Massenspektrometrie.....	45
Abbildung 4-1:	Bestimmung der Komplexgröße von AF4 und der4	51
Abbildung 4-2:	Resultate der Größenausschlusschromatographie von AF4 und der4	52
Abbildung 4-3:	Strep-Tag Reinigungen von AF4 und der4	54
Abbildung 4-4:	Tandem Affinitätsreinigung von AF4 und der4 über Step- und Flag-Tag.....	55
Abbildung 4-5:	Mittels Western Blot identifizierte Komplexpartner von AF4	57
Abbildung 4-6:	Mittels Western Blot identifizierte Proteine des der4-Komplexes.....	59
Abbildung 4-7:	MALDI-Ergebnisse eines tryptischen In-Gel-Verdau einer AF4-Elution.....	61
Abbildung 4-8:	MALDI-Ergebnisse eines tryptischen in-Gel-Verdau einer der4-Elution.....	62

Abbildung 4-9:	Identifizierung von ENL aus einem SDS-Gel der Co-Reinigung von AF4-Strep mit ENL.....	63
Abbildung 4-10:	Nachweis von CCNT1 als Komplexpartner von AF4 und der4 mittels IP.....	66
Abbildung 4-11:	Nachweis von NPM als Komplexpartner	67
Abbildung 4-12:	Identifizierung von DDX6, NF κ B1 und HEXIM1 als Komplexpartner von AF4 und der4	68
Abbildung 4-13:	Nachweis der Interaktion von Brd4 mit AF4	69
Abbildung 4-14:	In vitro Histon-Methyltransferase-Aktivität der gereinigten Proteinkomplexe von AF4 und der4.	70
Abbildung 4-15:	Reinigung des ENL-Proteins	72
Abbildung 4-16:	Komplexpartner des ENL-Proteins	73
Abbildung 4-17:	Western Blot der Interaktion von ENL mit AF4.....	74
Abbildung 4-18:	Untersuchung der Stabilisierung des AF4-Proteins durch Interaktion mit ENL....	76
Abbildung 5-1:	Zusammensetzung des AF4-Komplexes mit den neu identifizierten Interaktionspartnern.....	78
Abbildung 5-2:	Ergebnis des CBP-Western Blots auf die Strep-Elutionen von AF4 und der4	81
Abbildung 5-3:	Humane Histon-Lysin/Arginin-Methyltransferasen mit ihren Methylierungsstellen am Histon H3	85
Abbildung 5-4:	Zusammensetzung des der4-Komplexes	86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1:	Klassifikation der Leukämien.....	3
Tabelle 2-2:	Verbreitete MALDI-Matrizes für Biomoleküle.....	31
Tabelle 2-3:	Stärken und Schwächen der allgemein eingesetzten Proteinaffinitätsreinigungen.....	44
Tabelle 4-1:	Die identifizierten Proteine des AF4-Komplexes aus den nLC-MALDI-MS/MS-Experimenten	64
Tabelle 4-2:	Die identifizierten Proteine des der4-Komplexes aus den nLC-MALDI-MS/MS Experimenten	64
Tabelle 9-1:	Liste aller identifizierten Proteine aus den AF4-nLC-MALDI-MS/MS Experimenten.	141
Tabelle 9-2:	Liste aller identifizierten Proteine aus den der4-nLC-MALDI-MS/MS Experimenten.....	149
Tabelle 9-3:	Liste aller identifizierten Proteine aus den nLC-MALDI-MS/MS Experimenten der Negativkontrolle.....	151

1 Zusammenfassung

Funktionelle Multiproteinkomplexe stellen im Sinne von *Proteomics* das kleinste isolierbare Proteom dar. Die Untersuchung von Proteinkomplexen gibt uns die Möglichkeit, Funktionen innerhalb der Zelle oder des Zellkompartiments genauer zu verstehen. Erst durch das Verständnis der einzelnen kleinen Zusammenspiele innerhalb einer Zelle, können wir die Auswirkungen auf ein betreffendes Organ und damit auf den Körper betrachten. Wir erhalten dadurch auch Informationen über die Funktion von spezifischen Genen und können so Erklärungsansätze für Gendefekte finden und über mögliche Therapieansätze nachdenken.

Neben den Hefe-Zwei-Hybrid-Analysen und dem Nachweis von Protein-Interaktionen mittels Immunopräzipitationsexperimenten stellt die Massenspektrometrie seit den 90er Jahren ein essentielles Werkzeug der Proteom-Forschung dar. Sie entwickelte sich zu einem etablierten Verfahren für die Charakterisierung von Biomolekülen und ermöglicht die Identifizierung unbekannter Proteine eines Komplexes.

Das *MLL*-Gen auf Chromosom 11 Bande q23 ist in zahlreiche, reziproke chromosomale Translokationen verwickelt, die mit der Entstehung von akuten Leukämien assoziiert sind. Chromosomale Translokationen des *MLL*-Gens werden aufgrund ihrer sehr schlechten Prognose und Therapierbarkeit als Hochrisiko-Leukämien eingestuft. Bis heute konnten 64 Translokations-Partnergene identifiziert werden, wobei das *AF4*-Gen mit 42% bei allen untersuchten Leukämien und mit ca. 66% bei ALL (akute lymphatische Leukämie) den größten Prozentsatz ausmacht.

Bei der Translokation t(4;11) sind das *MLL*-Gen auf Chromosom 11 und das *AF4*-Gen auf Chromosom 4 beteiligt. Akute Leukämien mit einer t(4;11)-Translokation treten häufig bei Säuglingen und Kleinkindern auf und betreffen vorwiegend den lymphatischen Zweig des blutbildenden Systems. Durch die Translokation entstehen zwei neue Derivatchromosomen – *Derivat 11* (*MLL•AF4*, *der11*) und *Derivat 4* (*AF4•MLL*, *der4*). Beide Fusionsgene verfügen über einen intakten Leserahmen und führen zur Expression der zwei Fusionsproteine *MLL•AF4* (*der11*) und *AF4•MLL* (*der4*).

Der pathomolekulare Mechanismus der t(4;11)-vermittelten ALL ist bis heute noch nicht hinreichend geklärt. Funktionen des *der11*-Fusionsproteins werden zwar schon intensiv erforscht, aber es gibt noch keine Erkenntnisse über die Funktion des *der4*-Fusionsproteins.

Ähnlich sah die Situation zu Beginn dieser Arbeit für das *AF4*-Protein aus. Während schon einige Daten zur Funktion des *MLL*-Multiproteinkomplexes vorlagen, gab es nur wenige Informationen über die Funktion von *AF4*.

Im Zuge dieser Arbeit wurden der *AF4*- und der *der4*-Multiproteinkomplex mittels affinitätschromatographischer Methoden aus transient transfizierten 293T-Zellen erfolgreich

isoliert. Eine Größenbestimmung der Komplexe über eine Größenausschlusschromatographiesäule ergab für beide Komplexe eine Größe von ca. 2 MDa. Die Charakterisierung der beteiligten Interaktionspartner erfolgte mittels nLC-MALDI-MS/MS, Western Blot Analyse und Immunopräzipitation.

Es konnte gezeigt werden, dass AF4 zusammen mit den Proteinen ENL/AF9, CDK9, CCNT1, AF10, DOT1L und der RNA-Polymerase II in einem Komplex vorliegt. Bereits 2007 konnte dieser Komplex in einem Mausmodell isoliert werden. Damit fungiert der AF4-Komplex auch in humanen Zellen als Stimulator der RNA-Polymerase-II-abhängigen transkriptionellen Elongation und vermittelt eine DOT1L-abhängige H3K79-Methylierung, die einen aktiven Transkriptionsstatus aufrechterhält. Zusätzlich konnten 6 neue Interaktionspartner identifiziert werden (AF5q31, BDR4, DDX6, HEXIM1, NFκB1/RELA und NPM1). Die Anwesenheit von BRD4 und HEXIM1 lässt vermuten, dass der AF4-Komplex in einem aktiven und einem inaktiven Zustand vorliegen kann. Außerdem wird der AF4-Komplex möglicherweise über den NFκB-Signalweg reguliert bzw. durch die Anwesenheit von NFκB1 an dessen Zielgene rekrutiert.

Die Untersuchung des der4-Komplexes zeigte, dass er sich aus Mitgliedern der beiden Wildtyp-Proteinkomplexe zusammensetzt. So wurden die Proteine P-TEFb, HEXIM1, NFκB1, NPM1, DDX6 und das AF4 selbst aus dem AF4-Komplex sowie ASH2L, RBBP5, WDR5, DPY-30, CBP, HCF-1 und HCF-2 aus dem MLL-Komplex identifiziert. Der der4-Komplex weist somit partielle Eigenschaften des AF4- und MLL-Wildtyp-Proteins auf. Diese Eigenschaften sind ausreichend für eine kompetitive Situation zwischen dem der4-Komplex und den beiden AF4- und MLL-Wildtyp-Komplexen. Die Gleichgewichte dieser Wildtyp-Komplexe werden vermutlich gestört.

Für beide Komplexe wurde mit Hilfe eines *in vitro* Histon-Methyltransferase-Assays eine Histon-Methyltransferase-Aktivität nachgewiesen. Für den AF4-Komplex muss zusätzlich eine bisher noch unbekannte Methyltransferase-Aktivität angenommen werden, da eine Methylierung des Histons H3 in den ersten 46 Aminosäuren gezeigt werden konnte, die sich nicht auf die Methyltransferase-Aktivität des DOT1L-Proteins im AF4-Komplex zurückführen lässt. Die H3K4-Methyltransferase-Aktivität des der4-Komplexes wird auf die Anwesenheit des SET-Domänen-Komplexes (ASH2L, WDR5, RBBP5 und DPY-30) zurückgeführt.

Im Zusammenhang mit dem AF4-Protein wurde auch der ENL-Komplex untersucht. Mittels Western Blot konnten die Interaktionspartner AF4, CDK9, CCNT1, RNA-Polymerase II, NFκB1 und RING1 identifiziert werden. Damit ist auch das ENL mit dem globalen positiven transkriptionellen Elongationsfaktor P-TEFb assoziiert und beeinflusst die RNA-Polymerase-II-abhängige transkriptionelle Elongation.

2 Einleitung

2.1 Leukämie

2.1.1 Erkrankungen des hämatopoetischen (blutbildenden) Systems

Leukämie (griechisch: λευκός, leukós - weiß und αἷμα, haima - das Blut) bezeichnet eine maligne kanzeröse Entartung des hämatopoetischen Systems. Sie wird auch Hyperleukozytose oder Blutkrebs genannt und zeichnet sich durch eine ungehemmte Vermehrung an pathologisch veränderten Leukozyten im Knochenmark und im Blut aus. Diese abnormalen Blutzellen sind zu einer normalen Differenzierung nicht mehr in der Lage. Es kommt zur Verminderung anderer Blutbestandteile (Erythrozyten, Thrombozyten) und die Ansammlung solcher unreifen und nicht funktionstüchtigen Leukozyten führt im Knochenmark zu einer Insuffizienz. Zudem können die malignen Zellen auch Leber, Milz, Lymphknoten und andere Organe infiltrieren und dadurch deren Funktion stark beeinträchtigen. Für die Leukämieentstehung ist häufig eine einzige entartete Zelle im Knochenmark ausreichend.

Die Klassifikation der Leukämien in vier Gruppen erfolgt nach dem Krankheitsverlauf und nach dem Ursprung der Blutzellpopulation:

Akute	Chronische
<ul style="list-style-type: none"> • Akute myeloische Leukämien (AML): M₀-M₇ • Akute lymphatische Leukämien (ALL): L₁-L₃ 	<ul style="list-style-type: none"> • Chronische myeloische Leukämien (CML) • Chronische lymphatische Leukämien (CLL)

Tabelle 2-1: Klassifikation der Leukämien

Des Weiteren werden die akuten Leukämien aufgrund morphologischer Merkmale nach einem Schema der *French-American-British Working Group for Leukemia Classification* (FAB) in weitere Untergruppen eingeteilt. Wie aus obiger Tabelle zu erkennen ist, gliedert sich die AML in acht Untergruppen M₀-M₇, während bei der ALL die Subtypen L₁ - L₃ unterschieden werden.

Laut dem Robert-Koch-Institut erkranken jährlich etwa 9.100 Menschen in Deutschland an Leukämie. Sie sind mit 34,1% die häufigste Krebsart bei Kindern, wobei die akute lymphatische Leukämie (ALL) mit 27,0% am meisten diagnostiziert wird. Sie tritt bei den unter 4-Jährigen mehr als doppelt so häufig auf als in den anderen Altersgruppen (Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends, 6. überarbeitete Auflage, Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.). Berlin, 2008). Den größten Prozentsatz nehmen hierbei Aberrationen der Bande 11q23 ein.

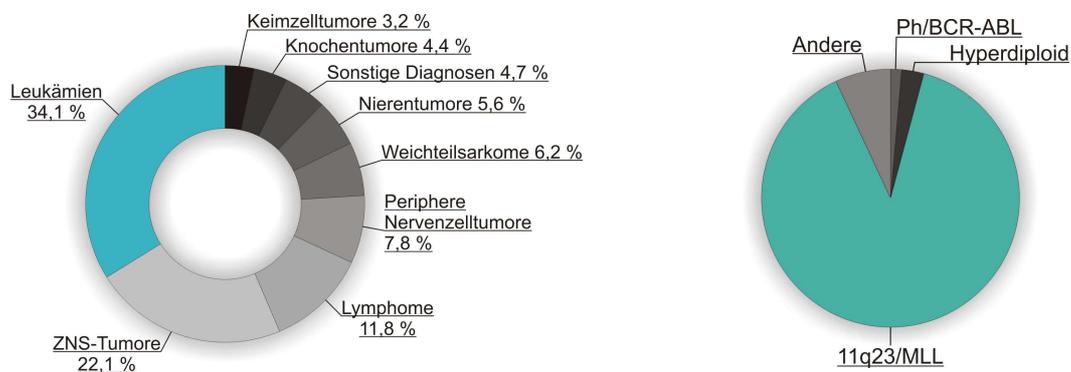


Abbildung 2-1: Krebs bei Kindern (ermittelt aus den Jahren 1997 – 2006) (Robert Koch-Institut)

Abbildung 2-2: Zytogenetische Subgruppen der ALL. Inzidenz verschiedener zytogenetischer Veränderungen bei Kleinkindern (Hoffbrand et al., 2003)

2.1.2 Chromosomale Translokationen als Ursache von Leukämie-Erkrankungen

Die meisten menschlichen Leukämien und Lymphome sind mit chromosomalen Translokationen assoziiert. Wiederkehrende chromosomale Translokationen dienen als Marker für bestimmte Leukämie- oder Lymphomformen. Sie treten häufig in hämatopoetischen Stammzellen auf und sind mit bestimmten klinischen und pathologischen Wesensformen der Erkrankung eng verbunden. Zudem sind sie heute von großer prognostischer Bedeutung. Die Art der Translokation ist entscheidend für die Krankheitsprognose und das optimale Behandlungsprotokoll des Patienten (Grimwade et al., 1998). Die sensitivste Methode zur Bestimmung des Translokationstyps stellt zurzeit die Probenuntersuchung von Leukämiepatienten mittels LDI-PCR (*Long Distance Inverse-PCR*) dar (Meyer et al., 2005). Sie erlaubt eine zuverlässige und schnelle Bestimmung der beteiligten Gene (inklusive neuer Partnergene), und damit eine umgehende Entscheidung bezüglich der anzuwendenden Therapieprotokolle. Außerdem kann anschließend der Therapieverlauf auf molekularer Ebene mittels Patienten-spezifischen Sonden¹ verfolgt werden. Dadurch ist eine quantitative Aussage über die im Körper des Patienten verbliebenen Tumorzellen möglich.

Bei akuten Leukämien treten häufig reziproke Translokationen (lateinisch: *reciprocus*: wechselseitig, gegenseitig) auf, bei denen ein Stückaustausch zwischen nicht-homologen Chromosomen

¹ Patienten-spezifische Sonden sind Oligonukleotide, die dazu dienen, Blutzellen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion auf das Vorhandensein residueller Tumorzellen (MRD; *minimal residual disease*) zu untersuchen. Die Sensitivität dieser Technik ermöglicht es, eine einzige Tumorzelle unter 100 000 bis 1 000 000 normalen Zellen aufzuspüren.

stattgefunden hat. Diese Translokation gehört zu den balancierten Aberrationen. Ein Chromosom oder ein Chromosomenabschnitt wird dabei auf ein anderes Chromosom transloziert, wobei sich die Gesamtmenge des Erbguts nicht ändert, sondern im Gleichgewicht bleibt. Bei einer unbalancierten Translokation kommt es hingegen zu einer quantitativen Veränderung des Erbgutes, die dadurch verursacht wird, dass genetisches Material verloren geht (Deletionen) oder zusätzlich zum üblicherweise vorhandenen Genom vorliegt (Duplikationen; (Pedersen-Bjergaard & Rowley, 1994; Rabbitts, 1994). Sie treten meistens sekundär in soliden Tumoren während der Progressionsphase auf (Johansson et al., 1996).

Es können zwei verschiedene reziproke Translokationsformen unterschieden werden, die zur Fehlregulation und Entartung einer Zelle beitragen. Im ersten Fall sind oft Gene des Immunsystems betroffen. Der Grund liegt unter anderem in der fehlerhaften somatischen Rekombination der Gene von T-Zellrezeptoren und/oder Immunglobulinen bei der Ausreifung von Lymphozyten (Sanchez-Garcia & Rabbitts, 1993). Im Rahmen dieser Rekombinationsereignisse kann es vorkommen, dass zelluläre Proto-Onkogene unter den Einfluss eines starken immunzellspezifischen Enhancers gebracht werden, was zu einer Dysregulation ihrer Expression führt. Die wohl bekannteste chromosomale Dysregulation dieser Art ist die Translokation $t(8;14)(q24;q32)$ bei Burkitt-Lymphomen (Dalla-Favera et al., 1982; Taub et al., 1982). Es kommt dabei zu einer Verlagerung des Proto-Onkogens *c-myc* in den aktiven *IgH*-Locus von B-Zellen. Der starke Enhancer des *IgH*-Gens führt zu einer übermäßigen Expression des unveränderten c-Myc-Proteins und damit zur Transformation der Zelle.

Der zweite und auch häufigste Translokationstyp bei Leukämien führt zur Bildung eines chimären Fusionsgens. Die chromosomalen Brüche finden in den intronischen Bereichen der beteiligten Gene statt. Ein bekanntes Beispiel dafür ist die Translokation $t(9;22)(q34;q11)$ bei CML, die zu dem sogenannten Philadelphia-Chromosom führt. Bei dieser Translokation werden unter Erhalt des Leserahmens die N- bzw. C-terminalen Exons der Gene *bcr* und *abl* reziprok miteinander verknüpft, und es entstehen die beiden chimären Fusionsprodukte, BCR•ABL und ABL•BCR. Folglich kommt es zur Expression dieser Fusionsproteine, die letzten Endes zur Entartung der Zelle führen.

Viele der an einer solchen Translokation beteiligten Gene sind erforscht und beschrieben. Sie kodieren oft für Faktoren, die für die Entwicklung und Differenzierung der hämatopoetischen Zellen wichtig sind (Rabbitts, 1999). Die Bande q23 auf Chromosom 11 (das *MLL*-Gen) ist in besonders zahlreiche, reziproke chromosomale Translokationen mit solchen Faktoren verwickelt. Diese werden aufgrund ihrer sehr schlechten Prognose und Therapierbarkeit als Hochrisiko-Leukämien eingestuft. In über 70% der Fälle können sie bei Kleinkindern mit einer ALL und AML nachgewiesen werden (Biondi et al., 2000) und sind generell in 10% aller menschlichen Leukämien zu finden (Huret et al., 2001). Erst kürzlich konnten 64 Translokations-Partnergene

und ihre genaue Bruchpunktsregion identifiziert werden. Dabei sind 6 Translokationspartnergene an 85% der MLL-Translokationen beteiligt, wobei das *AF4*-Gen mit 42% bei allen untersuchten Leukämien und mit ca. 66% bei ALL den größten Prozentsatz ausmacht (Meyer et al., 2009).

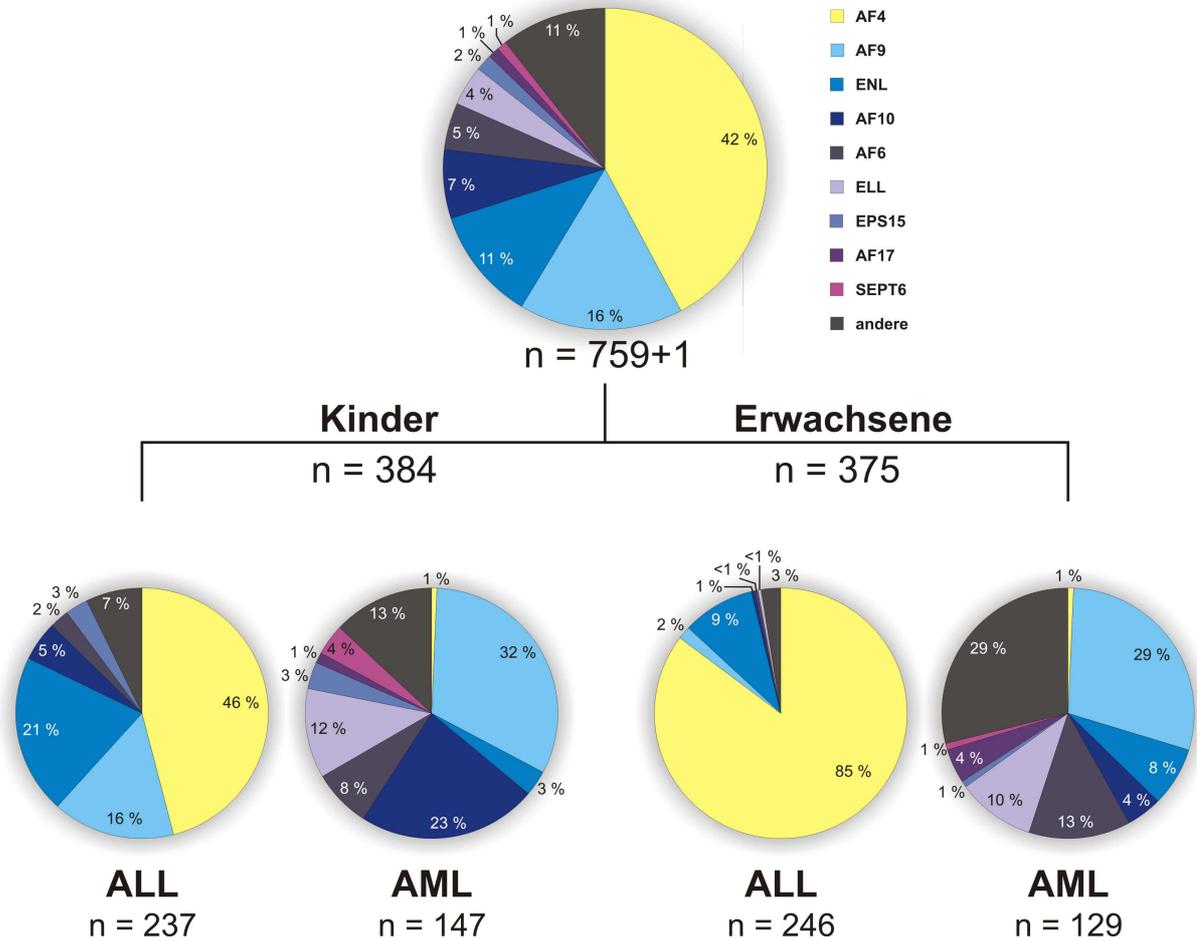


Abbildung 2-3: Verteilung von verschiedenen Translokationspartnergengen des *MLL* bei Kindern und Erwachsenen mit ALL und AML

n gibt die Anzahl der Patienten an. Aus Meyer et al., 2009, <http://web.uni-frankfurt.de/fb14/dcal/SupplFigure1.pdf>

2.1.3 Die chromosomale Translokation $t(4;11)(q21;q23)$

1979 wurde die chromosomale Translokation $t(4;11)(q21;q23)$ zum ersten Mal für einen pädiatrischen Fall einer akuten lymphoblastischen Leukämie beschrieben (Van den Berghe et al., 1979). Über ein Jahrzehnt später konnte mittels FISH-Experimenten (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) und dem Einsatz von YACs (*yeast artificial chromosomes*) der Bruchpunkt auf Chromosom 11 charakterisiert werden (Rowley et al., 1992) und nur ein Jahr später gelang die Identifizierung des an der Translokation beteiligten Gens, das den Namen *MLL* (*engl.: Mixed*

Lineage Leukemia) erhielt (Ziemin van der Poel et al., 1991). Weitere Namen für das auf der Bande 11q23 identifizierte Gen sind *ALL-1* (engl. *Acute Lymphoblastic Leukemia*; Cimino et al., 1991), *HRX* (engl. *Human Homolog of Trithorax*; Tkachuk et al., 1992) bzw. *Htrx1* (*Human Trithorax 1*; Djabali et al., 1992). Das zweite Gen konnte 1992 erstmals als Translokationspartner des *MLL*-Gens nachgewiesen werden und trägt die Bezeichnung AF4 (*ALL1 fused gene from chromosome 4*; Gu et al., 1992). Die genaue Exon-Intron-Struktur beider Gene wurde 1996/97 aufgeklärt (Nilson et al., 1996; Nilson et al., 1997).

2.1.3.1 Klinisches Erscheinungsbild einer t(4;11) assoziierten Leukämie

Akute Leukämien mit einer t(4;11)-Aberration treten häufig bei Säuglingen und Kleinkindern auf und betreffen vorwiegend den lymphatischen Zweig des blutbildenden Systems. Unter allen akuten lymphatischen Leukämien (ALL) im Kleinkindalter ist die t(4;11)-Translokation mit 30 bis 40% die häufigste Translokationsart (Heerema et al., 1999). Sie tritt aber auch mit bis zu 5% bei älteren Patienten mit Therapie-assoziierten Leukämien (t-ALL oder t-AML) auf. Dabei handelt es sich meistens um Patienten, deren primäre Krebserkrankung mit Topoisomerase II-Hemmstoffen behandelt wurde und die daraufhin eine sekundäre Leukämie entwickeln (Felix et al., 1995; Johansson et al., 1998).

T(4;11)(q21;q23)-positive Leukämien weisen als klinische Merkmale meistens ein geringes Alter, Hyperleukozytose ($>5 \times 10^{10}$ Leukozyten/l), Hepatosplenomegalie, starke ZNS-Infiltration und einen schlechten Therapie-Verlauf auf (Chen et al., 1993b; Rubnitz et al., 1996; Felix et al., 1999; Reaman et al., 1999). Ein sehr wichtiger prognostischer Marker ist hierbei das Alter der Patienten. Die Überlebensrate ist stark vom Alter abhängig (Pui et al., 2002; Pui et al., 2003) und liegt für Säuglinge unter 3 Monaten bei ca. 5% (Felix *et al.*, 2000). Diese Leukämie zeigt sich nahezu therapieresistent. Es kommt nach Chemotherapie und anfänglicher Remission sehr schnell zu einer Rezidivbildung. In diesem Stadium erweisen sich alle weiteren Behandlungsprotokolle als erfolglos.

Obwohl diese Leukämieform morphologisch als ALL klassifiziert wird, besitzen die Blasten nicht nur lymphatische (CD19, CD24) sondern auch myeloische (CD15) Oberflächenmarker. Dies weist daraufhin, dass die transformierten Zellen von sehr frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen abstammen, die noch in der Lage sind, in beide Linien des blutbildenden Systems zu differenzieren. Die endgültige Klassifizierung der leukämischen Blasten als pro B-ALL erfolgt aufgrund der fehlenden CD10 Expression bei gleichzeitiger Anwesenheit von CD19 (Pui et al., 1991; Chen et al., 1993b; Borkhardt et al., 2002).

2.1.3.2 Molekulare Grundlagen

Die beteiligten Gene bei der Translokation t(4;11) sind zum einen das *MLL*-Gen auf Chromosom 11 und zum anderen das *AF4*-Gen auf Chromosom 4. Durch die Translokation werden die beiden Chromosomen reziprok miteinander fusioniert, und es entstehen zwei neue Derivatchromosomen. An den Fusionsstellen sind nun die Derivatgene *Derivat 11* (*der11*) und *Derivat 4* (*der4*) entstanden. Derivat 11 setzt sich aus dem N-terminalen Teil des *MLL*-Gens und dem C-terminalen Teil des *AF4*-Gens zusammen und ist auf dem Chromosom 11 lokalisiert, während das Derivat 4 aus dem N-terminalen *AF4*-Genstück und dem C-terminalen *MLL*-Genstück besteht und auf Chromosom 4 zu finden ist.

Für das *MLL*-Gen konnte die Lage der Translokationsbruchpunkte, unabhängig von den beteiligten Partnergenen, bestimmt werden. Fast alle Bruchpunkte liegen in einer 8.3 kb großen Region, die auch als *breakpoint cluster region* (*bcr*) bezeichnet wird (Gu et al., 1992; Mitterbauer-Hohendanner & Mannhalter, 2004). Sie erstreckt sich über die Exons 8 bis 14, wobei die Verteilung der Bruchpunkte nicht homogen ist. Die Bruchpunktsregion des *AF4*-Gens liegt in einem vergleichsweise größeren genomischen Bereich von ca. 44 kb und wird von den Exons 3 und 6 flankiert, wobei auch hier die Bruchpunkte nicht homogen verteilt sind, sondern gehäuft im Intron 3 vorliegen (Reichel et al., 1999; Reichel 2001).

Die Aufrechterhaltung des Leserahmens ist unerlässlich für die Funktionalität der aus den Fusionsgenen resultierenden Fusionsproteine. Die Chromosomenbrüche und die anschließende Fusion finden in der Regel in den Intronbereichen der beteiligten Gene statt. Somit sind die Exons an den Umlagerungen nicht beteiligt und ein intakter Leserahmen der Fusionsgene ist gewährleistet (Marschalek et al., 1997).

2.2 Das MLL-Protein (Struktur und Funktion)

2.2.1 Das *MLL*-Gen

Wie bereits schon im Kapitel 2.1.3 erwähnt, gelang 1991 Ziemin van der Poel die Identifizierung des *MLL*-Gens auf Chromosom 11 Bande q23 (Ziemin van der Poel et al., 1991). In gleichen Jahr konnten Cimino und Kollegen zum ersten Mal den Genlocus des *MLLs* in einer akuten Leukämie nachweisen, was zu der Namensgebung *ALL-1* (*engl. Acute Lymphoblastic Leukemia*; Cimino et al., 1991) führte. Andere Arbeitsgruppen wählten die Bezeichnung *HRX* (*engl. Human Homolog of Trithorax*; Tkachuk et al., 1992) bzw. *Htrx1* (*Human Trithorax 1*; Djabali et al., 1992)

aufgrund der großen Homologie zu dem Trithorax Protein aus der Taufliege *Drosophila melanogaster*.

Das *MLL*-Gen erstreckt sich über einen Bereich von ca. 92 kb und besitzt 37 Exons (Nilson et al., 1996; Rasio et al., 1996). Genaue Kartierungen und Analysen für diesen Bereich zeigten ein 15 kb großes Transkript. Es konnten allerdings auch zwei kleinere Transkripte mit 13,5 und 5 kb nachgewiesen werden, deren Funktionen jedoch noch weitgehend unbekannt sind (Djabali et al., 1992; Tkachuk et al., 1992). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Spleißvarianten des größten Transkripts zu zwei unterschiedlich offenen Leserahmen mit 12.018 bzw. 11.919 Nukleotiden führen. Sie unterscheiden sich nur durch das Vorhandensein des Exons 2 und kodieren somit entweder für ein Protein mit 4.005 Aminosäuren (AS) oder für ein kleineres Protein mit 3.972 AS (Domer et al., 1993). Letzteres kann allerdings häufiger in Zellen nachgewiesen werden (Nilson et al., 1996; Meyer et al., 2006). Zusätzlich kommt es häufig zu einer Deletion von 9 b im Exon 15, so dass die daraus gebildeten Proteine dann nur noch aus 4.002 bzw. 3.969 AS bestehen. In dieser Arbeit wurde das 3.969 AS große *MLL*-Protein verwendet.

Bis auf wenige Ausnahmen wurden bis heute nahezu alle Bruchpunkte chromosomaler Translokationen des *MLL*-Gens innerhalb einer 8,3 kb großen *bcr* lokalisiert (Mitterbauer-Hohendanner & Mannhalter, 2004). Sie wird von zwei *Bam*HI-Restriktionsschnittstellen flankiert und umfasst die Exons 8-14, die für die ersten beiden von vier PHD-Fingern kodieren.

2.2.2 Funktionelle Domänen des *MLL*-Proteins

Mit einem Molekulargewicht von 435 kDa ist das *MLL*-Protein sehr groß. Es weist deutliche Homologien zum *Mll*-Protein der Maus und zum Protein Trithorax aus *Drosophila melanogaster* auf. Aufgrund ihrer Gemeinsamkeiten werden sie alle zusammen zur Trithorax-Familie gezählt. Proteine der Trithorax-Familie (TrxG) und der Polycomb-Familie (PcG) wurden ursprünglich in *Drosophila melanogaster* identifiziert. Es handelt sich dabei um positive (TrxG) und negative (PcG) Regulatoren homöostatischer Gene (*HOX*-Gene). Eine Schlüsselkomponente von TrxG- und PcG-Proteinen ist ihre Fähigkeit, bestimmte Regionen der DNA zu binden und dort über Veränderungen in der Chromatinstruktur, entweder einen aktiven Transkriptionsstatus (TrxG) oder einen inaktiven Transkriptionsstatus (PcG) für Gene zu vermitteln sowie diesen aufrecht zu erhalten (siehe dazu auch den Bericht von Schuettengruber et al., 2007).

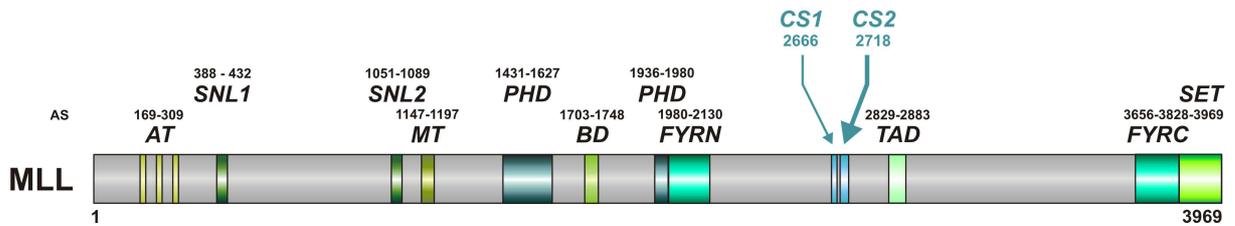


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung des MLL-Proteins mit seinen funktionellen Domänen

Die Aminosäuren geben die einzelnen Bereiche der Domänen an. Drei **AT**-Hacken: DNA-Bindemotiv; **SNL1/ 2**: subnukleäres Lokalisations-Signal 1/2; **MT**-Domäne: Cystein-reiches Motiv mit starker Homologie zur DNA Methyltransferase zur Bindung nicht methylierter CpG-Inseln; **PHD**-Finger 1-3 und 4: *Plant Homeo Domain* 1-3 und 4 (Zink-Finger-Motive); **BD**: Bromo-Domäne; **TAD**-Domäne: Transaktivierungsdomäne, vermittelt Protein-Protein-Interaktionen; **FYRN/C**: F/Y reicher Abschnitt im N-Terminus/C-Terminus; **CS1** und **CS2**: *Cleavage Site* 1 und 2, Erkennungsschnittstellen für Taspase1; **SET**-Domäne: besitzt H3K4-Methyltransferase-Aktivität

Die höchste Übereinstimmung zwischen dem humanen und dem *Drosophila*-Protein befindet sich im C-terminalen Teil der Proteine, der SET-Domäne. Diese wird vorrangig in Proteinen gefunden, die an transkriptionell regulatorischen Prozessen beteiligt sind (Tschiersch et al., 1994). Der Name dieser Domäne leitet sich von den in *Drosophila* gefundenen Proteinen Suppressor of variegation (Su(var) 3-9, Heterochromatin-assoziiertes Protein), Enhancer of zeste (E(z), Mitglied der Polycomb-Familie) und Trithorax ab. Während die ersten beiden Proteine als Transkriptionsrepressoren wirken und zur Familie der Polycomb-Gruppe gehören (Laible et al., 1997; Pirrotta, 1998; van Lohuizen et al., 1998), ist Trithorax ein positiver Transkriptionsregulator. Die SET-Domäne übernimmt somit nur eine transkriptionelle Regulation in Form der Histon-Methylierung, während die tatsächliche Ausprägung vom Gesamtprotein bestimmt wird. In diesem Zusammenhang soll hier erwähnt werden, dass für das MLL-Protein eine H3K4-Methyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden konnte, die einen positiven Einfluss auf die Genexpression hat (Milne et al., 2002; Nakamura et al., 2002). Dies soll aber in den Abschnitten 2.2.3 und 2.2.4 noch näher erläutert werden.

Die PHD-Finger (*plant homeo domain*) stellen neben der SET-Domäne zwei weitere stark homologe Bereiche in den Proteinen MLL und Trithorax dar. Es handelt sich dabei um besondere Zink-Finger-Motive. Sie stellen Cystein-reiche Sequenzabschnitte dar, die aber nicht wie gewöhnliche Zinkfinger DNA binden, sondern Protein-Protein-Interaktionspotential besitzen. Für die PHD-Finger 2 und 3 konnte eine Homodimerisierung nachgewiesen und zusätzlich eine Interaktion des dritten PDH-Fingers mit Cyclophilin E (Cyp33) gezeigt werden (Fair et al., 2001). Cyp33 verstärkt die Interaktion zwischen der Repressionsdomäne von MLL und der Histon-Deacetylase-1 und reguliert die Expression von *HOXC8*-Genen in MLL-abhängiger Weise (Homoeobox-Gen C8; Fair et al., 2001; Xia et al., 2003). Die PHD-Finger

vermitteln somit den Wechsel zwischen transkriptioneller Aktivierung und Hemmung. Aktuelle Studien unterstützen diese These. So konnten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander belegen, dass die Integration des dritten PHD-Fingers in die MLL Fusionsproteine MLL-AF9 bzw. MLL-ENL die onkogene Transformation von Zellen blockiert (Chen et al., 2008; Muntean et al., 2008). Aufgrund des dritten PDH-Fingers war nun eine Bindung von Cyp33 an die Fusionsproteine möglich. Die typischerweise durch die Fusionsgene ausgelöste erhöhte Expression von *HOX*-Genen wurde in Anwesenheit von Cyp33 unterbunden.

Zwischen dem dritten und vierten PHD-Finger ist die Bromodomäne (BD) lokalisiert, die man bei vielen Chromatin-assoziierten Proteinen findet. Durch Konformationsänderungen des Chromatins kann sie Einfluss auf die Transkription nehmen. Die BD besitzt eine hohe Affinität für acetylierte Lysinreste von Histonen. Diese Eigenschaft wird aber für MLL bisher nur vermutet (Dhalluin et al., 1999).

Im C-terminalen Bereich des MLL-Proteins befindet sich eine Transaktivierungsdomäne (TAD). Ihre transaktivierende Eigenschaft ist abhängig von der Interaktion mit dem nukleären Koaktivator CREB-Binding-Protein CBP (CREB = *Cyclic AMP Response Element-Binding Protein*). Durch die Interaktion mit der TAD-Domäne wird die Bindung von CBP an phosphoryliertes CREB begünstigt, was eine Transkriptionsaktivierung zur Folge hat (Ernst et al., 2001).

Im N-terminalen Bereich des MLL-Proteins befinden sich mehrere Bereiche, die DNA binden können. Einen solchen Bereich stellen die drei AT-Haken dar. Sie ermöglichen eine unspezifische Bindung an AT-reiche Bereiche in der kleinen Furche der DNA (Zeleznik-Le et al., 1994). Ein zweiter wichtiger Bereich, der in der Lage ist an DNA zu binden, ist die MT-Domäne. Es handelt sich dabei um einen Cystein-reichen Abschnitt, der an unmethylierte CpG-Dinukleotid-Sequenzen binden kann (Birke et al., 2002). Der Name beruht auf der Homologie zur DNA-Methyltransferase 1 (Ma et al., 1993). Die MT-Domäne befindet sich in der Repressionsdomäne von MLL. Dieser Bereich kann Histon-Deacetylasen, und PcG-Proteine wie BMI-1 und HPC2 rekrutieren. Diese Interaktionen werden durch die bereits beschriebene Bindung von Cyp33 an den dritten PHD-Finger in unmittelbarer Nachbarschaft zur MT-Domäne noch verstärkt (Xia et al., 2003).

Zwei nukleäre Lokalisationssequenzen SNL 1 und SNL 2 (*Speckled Nuclear Localization*) zwischen den AT-Haken und der MT-Domäne bewirken eine distinkte Lokalisation des MLL Proteins innerhalb des Zellkerns (Yano et al., 1997).

Für die vollständige Funktionsfähigkeit des MLL-Proteins wird es nur wenige Minuten nach seiner Translation in zwei unterschiedlich große Fragmente gespalten (Hsieh et al., 2003a; Yokoyama et al., 2002). Diese proteolytische Spaltung durch das Enzym Taspase 1 – einer Threonin-Aspartase – erfolgt an zwei konservierten Protease-Erkennungssequenzen CS1: QXD/GADD und CS2: QXD/GVDD (*Cleavage site 1 and 2*; X steht für eine hydrophile

Aminosäure; Hsieh et al., 2003b). Die zwei gebildeten Fragmente werden als MLL^N bzw. MLL^C bezeichnet und besitzen ein Molekulargewicht von ungefähr 300 bzw. 180 kDa (letzteres hat ein berechnetes Molekulargewicht von nur ca. 130 kDa, sein apparentes Laufverhalten im Gel liegt aber bei 180 kDa). Für beide MLL-Fragmente konnten unterschiedliche transkriptionelle Eigenschaften nachgewiesen werden. Während das MLL^C-Fragment stark aktivierend wirkt, konnten für das MLL^N-Fragment reprimierende Eigenschaften festgestellt werden (Yokoyama et al., 2002). Über intramolekulare Interaktionsdomänen dimerisieren die beiden generierten Proteinfragmente MLL^N und MLL^C. An dieser Interaktion der beiden Fragmente sind die Phenylalanin-Tyrosin-reiche Region im MLL^N (FYRN) und die Phenylalanin-Tyrosin-reiche Region im MLL^C (FYRC) beteiligt. Diese Stabilisierung beider MLL-Peptide führt zur subnukleären Lokalisation (Butler et al., 1997) des MLL-Komplexes und bildet die Grundlage für die anschließende Generierung eines MLL-Multiprotein-Komplexes (Nakamura et al., 2002).

2.2.3 Aufbau des MLL-Multiproteinkomplexes

Es gibt verschiedene Publikationen die unterschiedliche Zusammensetzungen des MLL-Multiprotein-Komplexes postulieren. 2002 gelang es Nakamura und seinen Kollegen zum ersten Mal einen MLL-Komplex zu reinigen. Sie konnten dabei 27 Proteine identifizieren, die mit dem MLL-Protein assoziiert vorlagen (Nakamura et al., 2002). So wurden unter anderem Proteine des SWI/SNF-Komplexes wie INI1 und BRM identifiziert. Bereits 1998 konnte Rozenblatt-Rosen zeigen, dass die SET-Domäne von MLL mit INI1 interagiert (Rozenblatt-Rosen et al., 1998). Proteine des SWI/SNF-Komplexes sind an der Umwandlung von Chromatin beteiligt (*chromatin remodeling*) und können demzufolge die Transkription aktivieren oder reprimieren. Außerdem konnten noch Komponenten des TFIID-Komplexes identifiziert werden, die an der basalen und Aktivator-abhängigen Transkription beteiligt sind, indem sie spezifisch Promotoren erkennen und den Präinitiationskomplex rekrutieren. Des Weiteren wurden Proteine des Histon-Deacetylase-Komplexes Sin3A identifiziert und Proteine, die an der RNA-Prozessierung mitwirken.

Ein weiterer, nur ca. 1 MDa großer MLL-Komplex wurde 2004 von Yokoyama und Kollegen gereinigt und analysiert. Dieser MLL-Komplex setzt sich aus insgesamt sieben Proteinen (inkl. MLL) zusammen, wobei nur die zwei WD40-*repeat*-Proteine, WDR5 und RbBP5, auch im großen MLL-Komplex von Nakamura zu finden waren (Yokoyama et al., 2004). Zusätzlich wurde ein weiteres Trithorax-Protein – ASH2L – identifiziert, das zusammen mit WDR5 und RbBP5 an die SET-Domäne von MLL bindet. Untersuchungen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* belegen, dass diese drei Proteine – bzw. ihre Homologen – essentiell für die H3K4-Methyltransferase-Aktivität sind (Nagy et al., 2002). WDR5, RbBP5 und ASH2L bilden einen Subkomplex, der mit

verschiedenen Mitgliedern der SET1-Familie von Histon-Methyltransferasen interagiert und in der Lage ist das Lysin4 am Histon H3 zu mono-, di- oder trimethylieren (Dou et al., 2006). WDR5 scheint dabei die Methyltransferase-Aktivität zu regulieren, indem es vorwiegend an dimethylierte Histone assoziiert (Wysocka et al., 2005) und eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Komplexes spielt. Es stabilisiert die Interaktion mit RbBP5 und bringt die SET-Domäne von MLL in räumliche Nähe zum Histon H3 (Dou et al., 2006; Ruthenburg et al., 2006). Außerdem hat WDR5 auch einen Einfluss auf die *HOX*-Gen-Expression. Ein *knock-down* von WDR5 mittels siRNAs (*small interference RNA*) führte zu einer deutlich verminderten *HOXC8*-Expression und einer reproduzierbaren Senkung des *HOXA9*-mRNA-Niveaus, obwohl die Bindung von MLL an *HOXC8* und *HOXA9* nicht gestört wurde (Wysocka et al., 2005). Des Weiteren interagiert der Transkriptionsfaktor Ap2 δ mit ASH2L und spielt eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von ASH2L zum *HOXC8*-Locus, was anschließend zu einer H3K4 Trimethylierung und Aktivierung des Gens führt (Tan et al., 2008).

Neueste Studien von zwei Arbeitsgruppen belegen, dass WDR5 die gleiche Bindungstasche für die Interaktion mit MLL und Histon H3 nutzt (Patel et al., 2008; Song & Kingston, 2008). Es wurde nachgewiesen, dass WDR5 die MLL-Aminosäure Arginin an Position 3765 erkennt, und dass eine Mutation dieser Aminosäure im MLL die Bindung an den Subkomplex (WDR5, RbBP5, ASH2L) verhindert und die H3K4-Dimethylierungsaktivität *in vitro* blockiert (Patel et al., 2008). Diese neuen Erkenntnisse sprechen nun gegen die von Dou und Ruthenburg aufgestellte Theorie, dass WDR5 eine Rolle als Vermittler der Bindung von MLL an H3K4 spielt, da eine gleichzeitige Bindung von H3 und MLL an die gleiche Bindungstasche eher unwahrscheinlich ist. Die Proteine HCF-1 und HCF-2 (*host cell factor*) interagieren über die MT-Domäne des MLL-Proteins mit dem Komplex. Sie spielen eine Rolle in der transkriptionellen Regulation und sind an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt. Natives HCF-1 ist ein Heterodimer aus HCF-1_N und HCF-1_C Untereinheiten, wobei die HCF-1_N-Untereinheit den Verlauf der G1-Phase fördert, während die HCF-1_C-Untereinheit für den einwandfreien Verlauf der M-Phase verantwortlich ist (Goto et al., 1997; Julien & Herr, 2003). Eine neuere Studie konnte belegen, dass während des Übergangs von der G1- in die S-Phase HCF-1 das MLL-Protein an E2F-sensitive Promotoren rekrutiert und somit Histon-Methylierung und transkriptionelle Aktivität vermittelt (Tyagi et al., 2007). HCF-1 reguliert den Zellzyklus, indem es temporär mit unterschiedlichen Proteinen assoziiert. So konnte nachgewiesen werden, dass HCF-1 in der Lage ist, selektiv zu bestimmten Zeiten des Zellzyklus mit transkriptionell aktivierenden Komponenten, wie dem MLL-Komplex und E2F1 (Aktivator-E2F) oder mit reprimierenden Komponenten, wie E2F4 (Repressor-E2F) und dem Sin3-Komplex, zu interagieren (Tyagi et al., 2007). Dies erklärt auch warum bei einer früheren Studie HCF-1 zusammen mit dem SIN3-Komplex und einem Trithorax-ähnlichen Methyltransferase-Komplex assoziiert vorgefunden wurde (Wysocka et al., 2003), während

Yokohama et al. keine Interaktion von SIN3-Faktoren mit dem makromolekularen MLL-Komplex finden konnte.

Eine weitere wichtige Komponente des von Yokoyama identifizierten MLL-Komplexes ist das Protein MENIN, das Produkt des Tumorsuppressor-Gens *MEN1* (*Multiple Endocrine Neoplasia type-1*), dessen Mutation mit dem multiplen endokrinen Neoplasie Syndrom Typ 1 assoziiert ist (Chandrasekharappa et al., 1997; Lemmens et al., 1997). MENIN interagiert mit dem N-Terminus von MLL (AS 4-55, Caslini et al., 2007) und reguliert zusammen mit diesem die Expression der *CDK-Inhibitor*-Gene p27 und p18 (*Cyclin Dependant Kinase*). Die Proteine dieser Gene sind etablierte Zellzyklus-Regulatoren. Milne und seine Kollegen konnten in Mäusen zeigen, dass Menin essentiell für die p18- und p27-Expression ist und dass Mll zusammen mit Menin an die Promotoren dieser Gene bindet (Milne et al., 2005). Des Weiteren ist Menin aufgrund der Interaktion mit Mll elementar für die Aufrechterhaltung der Hoxgenexpression, insbesondere von *Hoxa9* und *Hoxc8*. Ein *knock-down* von MENIN bzw. MLL mittels siRNA führte zu einer ähnlich verminderten *HOXA9*-Expression (Yokoyama et al., 2004), und Hughes und seine Kollegen konnten mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) nachweisen, dass Menin direkt an den *Hoxc8*-Locus bindet (Hughes et al., 2004). Darüber hinaus konnte eine Interaktion zwischen Menin und dem phosphorylierten Serin an Position 5 des CTD-Endes der RNA-Polymerase II gezeigt werden, was den Menin/Histon-Methyltransferase-Komplex nun mit der Transkriptionsmaschinerie in Verbindung bringt (Hughes et al., 2004). Einen guten Überblick über die verschiedenen Funktionen von MENIN – auch in Zusammenhang mit MLL – gibt der Bericht von Wu und Hua (Wu & Hua, 2008).

Als weiteres Mitglied des MLL-Komplexes konnte die H4K16 Acetyltransferase MOF identifiziert werden. Sie interagiert über ihre Zinkfinger-Domäne mit dem C-terminalen Teil des MLLs. Der MLL-Komplex besitzt somit sowohl Methyltransferase- als auch Acetyltransferase-Aktivität. Beide Funktionen scheinen erforderlich zu sein, um eine aktive Chromatinstruktur und eine optimale Transkription von Zielgenen aufrecht zu erhalten (Dou et al., 2005). Zusätzlich konnte bei dieser Studie noch eine Interaktion zwischen MLL, MOF und RING2 nachgewiesen werden.

Alle erwähnten Interaktionspartner, inklusive ihrer Interaktionsdomänen (soweit bekannt) mit dem MLL-Protein, sind in Abbildung 2-5 in einer schematischen Darstellung der Ausbildung des MLL-Multiproteinkomplexes zusammengefasst.

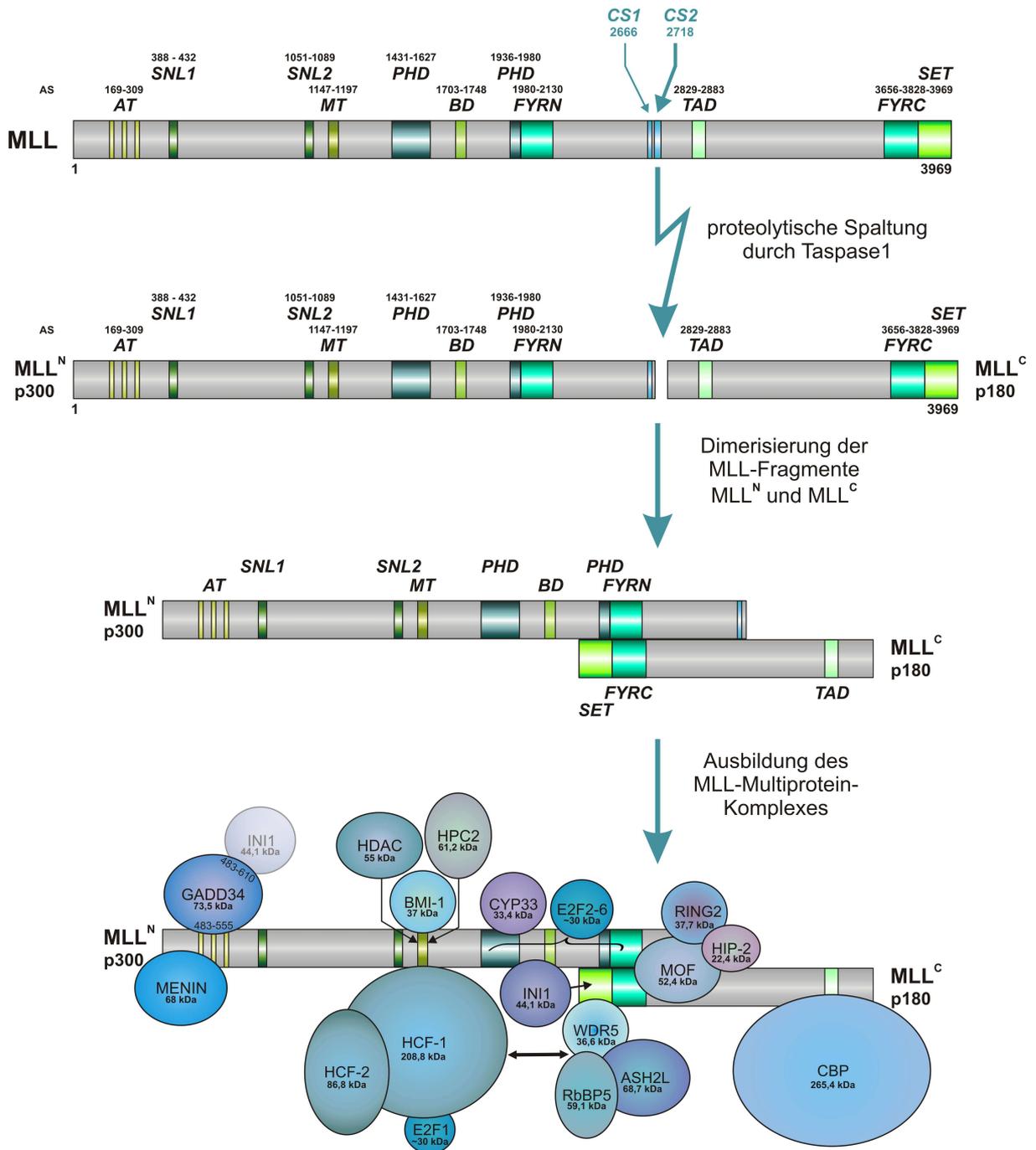


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der Bildung des MLL-Multiproteinkomplexes

Zunächst erfolgt die proteolytische Spaltung des MLL-Proteins an den Schnittstellen CS1 und CS2 durch das Enzym Taspase1. Anschließend dimerisieren die Fragmente MLL^N und MLL^C über die intramolekularen Interaktionsdomänen FRYN und FRYC und bilden damit die Plattform zur Ausbildung des Multiproteinkomplexes. Die Abkürzungen der Domänen des MLL-Proteins wurden bereits in Abbildung 2-4 erläutert.

2.2.4 Funktion des MLL-Proteinkomplexes

Wie bereits schon im Abschnitt 2.2.2 erwähnt, gehört das MLL-Protein aufgrund seiner Homologie zum Trithorax-Protein aus *Drosophila melanogaster* zur Trithorax-Familie (TrxG). Somit ist es naheliegend, dass beide Proteine Gemeinsamkeiten in ihrer Funktion im jeweiligen Organismus aufweisen. Proteine der Trithorax-Familie und ihre Gegenspieler der Polycomb-Familie (PcG) wurden ursprünglich in *Drosophila melanogaster* identifiziert. Es handelt sich dabei um positive (TrxG) und negative (PcG) Regulatoren homöostatischer Gene (*HOX*-Gene), die einen entscheidenden Einfluss auf die Embryonalentwicklung haben. Indem sie eine geregelte *HOX*-Genexpression gewährleisten und diese aufrechterhalten, garantieren sie eine präzise Segmentierung des Körperbaus. Sie erzeugen an den gebundenen Chromatinabschnitten charakteristische Histon- und DNA-Methylierungsmuster, wodurch die stabile Vererbung des aktiven oder reprimierten Zustands der jeweiligen Gene gesichert wird und somit ein „transkriptionelles Gedächtnis“ etabliert wird.

HOX-Gene stellen Transkriptionsfaktoren dar, die an der Entwicklung verschiedener Gewebe beteiligt sind und auch einen Einfluss auf das hämatopoetische System haben (Abramovich & Humphries, 2005). Mausmodelle konnten eindeutig belegen, dass Mll eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der *Hox*-Genexpression einnimmt und auch an der Entwicklung des Skeletts und des hämatopoetischen Systems beteiligt ist. Eine *Mll-knock-out* Studie von Yu et al. konnte zeigen, dass die Expression von *Hox*-Genen (*Hoxa7*) zwar eingeleitet wurde, aber keine Aufrechterhaltung während der Entwicklung gewährleistet werden konnte (Yu et al., 1995, Yu et al., 1998). Die homozygoten *Mll-knock-out*-Embryos ($Mll^{-/-}$ -Embryos) starben spätestens am Tag 10,5 der Embryonalentwicklung. Dieser Zeitpunkt ist der Start der Organogenese. Der heterozygote *knock-out* ($Mll^{+/-}$) war zwar lebensfähig, zeigte aber homöotische Skelettdeformationen insbesondere im thorakalen Wirbelbereich, ein retardiertes Wachstum und hämatopoetische Veränderungen wie Anämie und Thrombozytopenie (Yu et al., 1995). Auch bei einer weiteren *Mll-knock-out* Studie starben die $Mll^{-/-}$ -Embryos zwischen Tag 11,5 und 14,5. Die hämatopoetischen Vorläuferzellen waren bei diesen Embryos drastisch reduziert, was zu der Annahme führt, dass Mll das Wachstum von hämatopoetischen Vorläuferzellen reguliert (Yagi et al., 1998).

Im Gegensatz dazu waren Mäuse, die ein verkürztes Mll ohne SET-Domäne exprimierten, lebensfähig und fruchtbar (Terranova et al., 2006). Dies führt zu der Überlegung, dass anscheinend eine einwandfreie Bildung des MLL-Komplexes und Funktionen von Mll, die nicht über die SET-Domäne vermittelt werden, für eine korrekte embryonale Entwicklung notwendig sind. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass es zu einer drastisch verringerten H3K4-Monomethylierung und einer defekten DNA-Methylierung an denselben *Hox*-Loci kommt.

Andere Arbeiten belegen eine direkte Bindung von MLL an genomische DNA über einen großen Bereich der *Hoxa9*- und *Hoxa8*-Loci (Milne et al., 2002; Guenther et al., 2005). Es konnte erst kürzlich nachgewiesen werden, dass Mll CpG-Cluster innerhalb des *Hoxa9*-Gens vor der Methylierung schützt und so die Aufrechterhaltung der Genexpression während der Entwicklung gewährleistet (Erfurth et al., 2008). Guenther und Kollegen konnten außerdem mittels eines ChIP-DNA-Microarrays aufzeigen, dass MLL an mehr als 2000 Promotoren mit RNA-Polymerase II co-lokalisiert (Guenther et al., 2005).

Die Methyltransferase-Aktivität von MLL wird von der stark konservierten SET-Domäne des Proteins vermittelt (Nakamura et al., 2002). Histonmodifikationen spielen eine wichtige Rolle bei der epigenetischen Programmierung und folglich könnte das MLL-Protein aufgrund seiner Methyltransferase-Aktivität daran beteiligt sein. Arbeiten von Hanson und seinen Kollegen unterstützen die Theorie, dass MLL epigenetische Funktionen besitzt, denn BmiI, – ein CpG-Mitglied – und Mll zeigten in Mäusen eine antagonistische Rolle in der Skelett-Entwicklung. Es gelang dieser Arbeitsgruppe den transformierten Phänotyp in heterozygoten MLL^{+/-}-Embryonen aufzuheben, wenn sie mit heterozygoten BmiI-Mäusen gekreuzt wurden. Außerdem ergaben Untersuchungen von MLL- bzw. BmiI-defizienten embryonalen Fibroblasten eine reziproke Regulation der *Hox*-Gene (Hanson et al., 1999).

Bereits Yu und Yagi konnten mit ihren *knock-out*-Mäusen belegen, dass Mll auch an der Entwicklung des hämatopoetischen Systems beteiligt ist (Yu et al., 1995; Yagi et al., 1998). Die Expression von Mll wurde in Organen des hämatopoetischen und des lymphoiden Systems nachgewiesen (Butler et al., 1997) und Arbeiten von Look belegen, dass eine korrekte Hox-Genexpression essentiell für Differenzierungsprozesse von hämatopoetischen Vorläuferzellen (Look et al., 1997) ist. Einen weiteren Beweis für den Einfluss von MLL auf die Hämatopoese gelang Ernst und seinen Kollegen (Ernst et al., 2004). Sie konnten zeigen, dass MLL essentiell für die Entwicklung hämatopoetischer Stammzellen und Vorläuferzellen ist.

Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass MLL über die Assoziation mit HCF-1 und E2F1 an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt ist. HCF-1 rekrutiert das MLL-Protein an E2F-sensitive Promotoren während des Übergangs von der G1- in die S-Phase und vermittelt somit Histon-Methylierung und transkriptionelle Aktivität (Tyagi et al., 2007). Darüber hinaus hat MLL über die Interaktion mit Menin Einfluss auf die p18- und p27-Expression. Die Proteine dieser Gene sind bekannte Zellzyklus-Regulatoren. (Milne et al., 2005). Auch ein *Taspase1-knock-out*-Modell belegt, dass MLL auf die Steuerung des Zellzyklus Einfluss nimmt. Bei diesen *Taspase1*-defizienten Mäusen findet keine Prozessierung des Mll-Proteins mehr statt (Takeda et al., 2006). Analysen ergaben, dass die Expression der Cyclin A-, B- und E-Typen deutlich herunter reguliert war. Außerdem konnte eine reduzierte H3K4-Trimethylierung an den Genen von Cyclin E1 und E2 festgestellt werden. Es wurde vermutet, dass die Regulation der Cycline über die Interaktion

von Mll mit verschiedenen E2Fs stattfindet, die wiederum Schlüsselproteine im Verlauf des Zellzykluses darstellen. Schon bereits Dou belegte eine Interaktion von MLL mit dem E2F6-Protein (Dou et al., 2005).

Neben den Hox-Genen könnte es aber auch noch andere wichtige Targets von MLL geben. Neuere Entwicklungen von Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) in Kombination mit Microarray-Analysen (ChIP on chip) konnten zeigen, dass MLL mit Tausenden von Promotoren assoziiert, und dass bis zu 90% dieser MLL-Promotoren auch von der RNA-Polymerase II belegt werden. Dies führt zu der Überlegung, dass MLL vielleicht auch ein globaler Regulator der Transkription sein könnte (Milne et al., 2005; Guenther et al., 2005).

2.3 Das AF4-Protein (Struktur und Funktion)

2.3.1 Das AF4-Gen

Wie bereits unter 2.1.3 erwähnt, wurde das menschliche *AF4*-Gen (auch *FEL* genannt (*four eleven leukemia*, Chen et al., 1993a; Morrissey et al., 1993)) 1992 zum ersten Mal als Translokationspartner des *MLL*-Gens beschrieben (Gu et al., 1992) und stellt, wie aus Abbildung 2-3 hervorgeht, mit 42% den häufigsten Translokationspartner von *MLL* dar.

Die genaue Exon/Intron-Struktur des humanen *AF4*-Gens wurde 1997 in der Arbeitsgruppe von Professor Marschalek aufgeklärt (Nilson et al., 1997). Es umfasst 300 kb und ist auf dem Chromosom 4 Bande q21 lokalisiert. Sein 10,5 kb großes mRNA Transkript wird von 23 Exons kodiert, wobei vier dieser Exons alternative erste Exons darstellen (1a1 – 1a2, 1b und 1c). Während des Spleiß-Prozesses können dabei zwei alternative Transkripte gebildet werden, die – je nachdem welches erste Exon verwendet wird – als FelA (Exon 1a) oder FelB (Exon 1b) bezeichnet werden. Zusätzlich besitzt das *AF4*-Gen eine alternative Polyadenylierungsstelle im Intron 3, die genutzt werden kann, um ein 2,8 kb kleines Transkript zu generieren, das entsprechend der eingeführten Nomenklatur als FelC bezeichnet wird. Die Bruchpunktsregion des *AF4*-Gens liegt in einem genomischen Bereich von ca. 44 kb und wird von den Exons 3 und 6 flankiert (Nilson et al., 1997; Reichel et al., 1999; Reichel 2001).

2.3.2 Funktionelle Domänen des AF4-Proteins

Das *AF4*-Gen wird in allen Geweben sowie in hämatopoetischen Zellen ubiquitär exprimiert (Chen, 1993a; Frestedt, 1996). Das daraus resultierende AF4-Protein konnte im Zellkern lokalisiert werden (Nilson et al., 1997) und hat ein berechnetes Molekulargewicht von 131 kDa. Sein Laufverhalten in einem SDS-Gel entspricht allerdings einem Molekulargewicht von ungefähr

175 kDa. Es gehört zur ALF-Proteinfamilie (AAF4, LLAF4 und FFMR2; Nilson et al., 1997), zudem auch das Protein AF5q31 zählt (Taki et al., 1999). Außer AF4 sind auch LAF4 und AF5q31 als Translokationspartner des MLL identifiziert worden (Ma & Staudt 1996; von Bergh et al., 2002). Nur das FMR2 konnte als einziges Mitglied dieser Proteinfamilie nicht mit einer Leukämie in Verbindung gebracht werden. Allerdings führt eine Inaktivierung des *FMR2* Gens auf Chromosom X zu einer nicht spezifischen familiären mentalen Retardierung (Chakrabarti et al., 1996; Gecz et al., 1996).

Alle Proteine der ALF-Familie haben gemeinsam, dass sie 5 hoch konservierte Domänen beinhalten: eine N-terminale Homologiedomäne (NHD); die hochkonservierte Domäne der ALF-Proteinfamilie (ALF); eine Serin-reiche Region (pSer), die die minimale Transaktivierungsdomäne TAD beinhaltet; eine Kernlokalisierungssequenz (NLS, *nuclear localisation sequence*); und eine C-terminale Homologiedomäne (CHD). Über die genaue Funktion der einzelnen Domänen ist aber noch wenig bekannt, auch wenn gezeigt werden konnte, dass AF4 und LAF4 DNA binden können und transkriptionell aktivierend wirken (Prasad et al. 1995; Ma & Staudt 1996).



Abbildung 2-6: Schematische Darstellung des AF4-Proteins und seiner funktionellen Domänen

Die Abkürzungen der Domänen sind im darüber stehenden Text näher erklärt. Die Aminosäuren geben die einzelnen Bereiche der Domänen an. Die Aminosäuren 258-346 innerhalb der ALF-Domäne zeigen die SIAH-Bindungsstelle.

2.3.3 Interaktionen des AF4-Proteins/ Aufbau des AF4-Proteinkomplexes

In der Arbeitsgruppe von Prof. Marschalek konnte 2004 durch Interaktionsstudien nachgewiesen werden, dass die E3-Ubiquitin-Ligasen SIAH1 und SIAH2 mit AF4 interagieren. Dabei konnte die spezifische Bindung von AF4 an SIAH1 nachgewiesen werden. Daraus resultiert der proteasomale Abbau des AF4-Proteins durch die SIAH1 vermittelte Polyubiquitylierung. Als minimale Kontaktdomäne für diese Interaktion konnte im Bereich der hoch konservierten ALF-Domäne des AF4-Proteins das Erkennungsmotiv PxAxVxP der SIAH Ziel-Proteine identifiziert werden (House et al., 2003). Da das Wildtyp-AF4-Protein in Zellen ohne Behandlung mit einem Proteasominhibitor schwer nachweisbar ist, kann von einer strikten Regulierung der AF4-Proteinmenge durch SIAH ausgegangen werden (Bursen et al, 2004).

Im gleichen Jahr konnte auch erstmals gezeigt werden, dass AF4 und AF9 einen stabilen im Zellkern lokalisierten Komplex bilden (Erfurth et al., 2004). Die Interaktionsdomänen beider

Proteine liegen dabei im C-Terminus in den hoch konservierten Bereichen der jeweiligen Proteinfamilie. Dies lässt vermuten, dass auch die Proteine der ALF-Familie mit AF9 interagieren könnten bzw. auch umgekehrt eine Interaktion von AF4 mit dem zum AF9 homologen Protein ENL stattfindet. Weitere Untersuchungen ergaben, dass in den Fusionsproteinen MLL-AF4 und MLL-AF9 diese Interaktionsdomänen noch vorhanden sind. Es konnte eine Interaktion von AF9 mit MLL-AF4 gezeigt werden, die zu einer veränderten Lokalisation von AF9 im Zellkern führte. Diese Interaktion könnte somit möglicherweise eine Rolle in der Leukämogenese spielen. Weitere Untersuchungen unterstützten diese Theorie, denn ein Peptid, welches die Interaktion zwischen AF4 und AF9 aufhebt, konnte Apoptose in t(4;11)-Zellen auslösen (Srinivasan et al., 2004). Neben der bereits erwähnten Möglichkeit einer Interaktion von AF4 mit ENL könnte auch eine Interaktion mit dem Polycomb Protein PC3 und dem Protein BCoR (BCL6 Co-Repressor) stattfinden. Diese Proteine sind an der Chromatin-abhängigen Genrepression beteiligt und Untersuchungen belegen, dass sie mit AF9 und/oder ENL zusammen vorliegen (Garcia-Cuellar et al., 2001; Hemenway et al., 2001, Srinivasan et al., 2003).

2005 konnten Zeisig und seine Kollegen mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System nachweisen, dass ENL mit AF4, AF5q31, AF10, PC3 und der H3K79-Methyltransferase DOT1 interagiert. Ein Komplex, der die Proteine AF4, ENL und PC3 enthielt, konnte aus 293T-Zellen isoliert werden, wobei die Größenbestimmung dieses Komplexes eine Beteiligung weiterer Proteine vermuten ließ (Zeisig et al., 2005). Diese gefundenen Interaktionen zwischen den einzelnen Proteinen unterstreichen auch noch Publikationen anderer Arbeitsgruppen. Sie konnten eine Interaktion von murinem Af9 mit Dot1a nachweisen sowie die Interaktion von AF10 oder MLL-AF10 mit DOT1L (Zhang et al., 2006; Okada et al., 2005).

Zeisig und seine Kollegen vermuteten außerdem eine Beteiligung des positiven Transkriptions-Elongations-Faktors b (P-TEFb) am Komplex, da bereits für das ALF-Familienmitglied AF5q31 eine Interaktion nachgewiesen wurde (Estable et al., 2002). P-TEFb ist ein Dimer aus CDK9 (Cyclin-abhängige Kinase 9) und CCNT1 (CyclinT1). Es ist in der Lage die C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II (RNA- Polymerase II CTD) zu phosphorylieren, und ermöglicht damit eine effiziente transkriptionelle Elongation (Zhou & Yik, 2006). Zeisig und seine Kollegen postulierten zum ersten Mal einen Komplex mit AF4, der an Histone bindet und an der transkriptionellen Elongation beteiligt sein könnte.

2007 konnte gezeigt werden, dass in murinen Zellen Af4 zusammen mit den Proteinen Cdk9, Ccnt1, Af10, Dot1 und Enl bzw. Af9 vorliegt. Af4 fungiert hier in diesem Modell zusammen mit seinen Interaktionspartnern als positiver Regulator der Gentranskription und vermittelt die Dot1-abhängige H3K79 Methylierung (Bitoun et al., 2007). Die Existenz dieses Komplexes wurde auch von Mueller und seinen Kollegen bestätigt, wobei bei dieser Untersuchung der Komplex über das

ENL isoliert wurde. Dabei konnten zusätzlich Mitglieder der Polycomb Gruppe und weitere Proteine der ALF-Familie gefunden werden (Mueller et al., 2007).

Auf die genauen Funktionen im Einzelnen soll noch näher im nächsten Kapitel eingegangen werden. Aufgrund der momentanen Literatur ergibt sich folgende schematische Zusammensetzung des AF4-Proteinkomplexes:

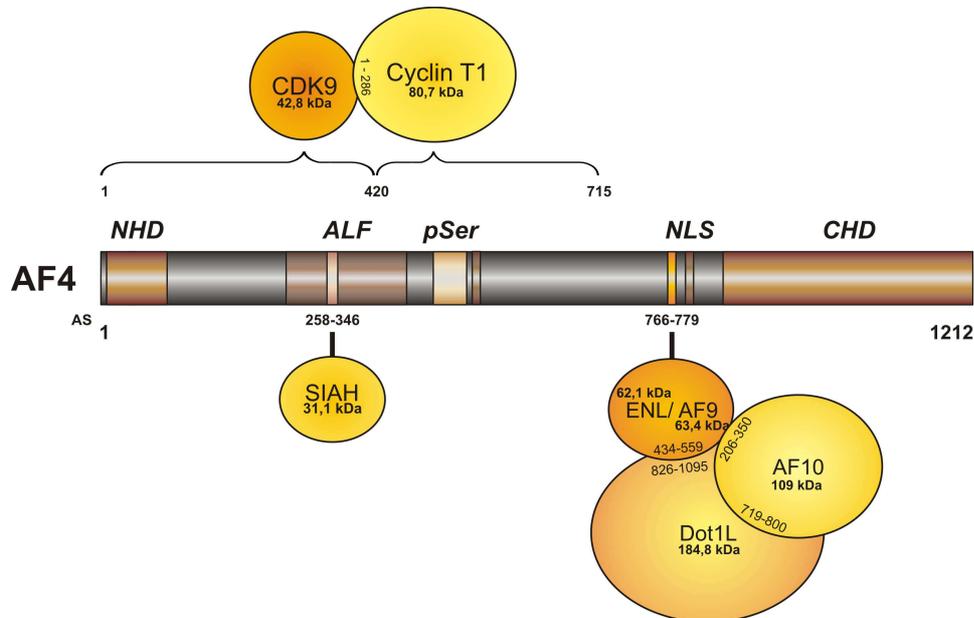


Abbildung 2-7: Zusammensetzung des AF4-Proteinkomplexes

Dieses Bild zeigt ein Modell des AF4-Komplexes aufgrund der bislang eindeutig identifizierten Interaktionspartner. Die Zahlen am AF4 und an den jeweiligen Proteinen geben die Interaktionsdomänen/Aminosäurebereiche der Proteine mit dem jeweiligen Protein an und sind der momentanen Literatur entnommen. NHD: N-terminale Homologiedomäne, ALF: hoch konservierte Domäne der ALF-Proteinfamilie, pSer: Serin-reiche Region, NLS: Kernlokalisierungssequenz, CHD: C-terminale Homologiedomäne

2.3.4 Funktionen des AF4-Proteinkomplexes

Da es sich bei AF4 und den Mitgliedern der ALF-Proteinfamilie um nukleäre Proteine mit transaktivierenden Eigenschaften handelt, wurde ihnen lange Zeit eine Funktion als transkriptionelle Regulatoren zugesprochen (Prasad et al. 1995; Ma & Staudt 1996, Hillman et al., 2001).

Das AF4-Transkript wird zwar ubiquitär exprimiert (Chen et al., 1993a; Frestedt et al, 1996), jedoch konnte in Mäusen nachgewiesen werden, dass das *mAf4*-Gen überwiegend in Thymozyten und sehr stark in lymphoiden Organen exprimiert wird (Isnard et al., 1998). Ein murines Af4 *knock-out* Modell führte zu einer Störung der B- und T-Zellentwicklung in den Mäusen (Isnard et al., 2000). Die Anzahl reifer B-Zellen im Knochenmark war signifikant reduziert und im Thymus

konnte ein starker Rückgang CD4/CD8-doppeltpositiver Zellen festgestellt werden. Außerdem waren die Af4-negativen Mäuse 20% kleiner als ihre gesunden Artgenossen und lebten maximal bis zum Tag 10 nach der Geburt. Diese Ergebnisse belegen, dass dem Af4-Protein eine kritische Rolle in der lymphoiden Entwicklung zukommt und dass vielleicht das Af4-Gen den onkogenen Prozess einer t(4;11)-Leukämie in die lymphatische Richtung lenkt. Zusätzlich scheint das Af4, neben der Beteiligung bei der Hämatopoese, auch noch einen Einfluss auf Zellwachstums- und Differenzierungsprozesse zu haben, was das geringe Gewicht der Mäuse erklären würde.

Der Einfluss von AF4 auf das Wachstum wurde von Bursen und ihren Kollegen bestätigt. Eine Überexpression von AF4 in MEF-Zellen (*murine embryonic fibroblasts*) führte, neben dem Verlust der Kontaktinhibition, zur Wachstumstransformation der Zellen (Bursen et al., 2004). Diese onkogenen Eigenschaften konnten auf den AF4-N-Terminus zurückgeführt werden, da auch das AF4-MLL-Fusionsprotein zu einer Transformation muriner embryonaler Fibroblasten führte. AF4 stellt somit ein potentes Proto-Onkogen dar, das – aufgrund der Bindung an SIAH und dem damit verbundenen proteasomalen Abbau – einer strikten Regulation unterliegt.

Isaacs und seine Kollegen belegten 2003, dass das AF4 auch an der korrekten Entwicklung und Funktion des zentralen Nervensystems (ZNS) beteiligt ist (Isaacs et al., 2003). Mäuse mit einer Missense-Mutation im hoch konservierten PxAxVxP-Motiv (SIAH-Bindungsstelle) des Af4-Proteins, wiesen einen drastischen Verlust von Purkinje-Zellen im Kleinhirn auf. Dieser Verlust ist bereits drei Wochen nach der Geburt feststellbar. Die Tiere entwickeln einen grauen Star und besitzen einen ruckartigen ataktischen Gang². Diese stark eingeschränkten motorischen Fähigkeiten führten zu dem Namen „*robotic mouse*“ (Eine genauere Charakterisierung der „*robotic mouse*“ ist im Artikel von Oliver et al., 2007 zu finden). Aufgrund der Mutation des hoch konservierten PxAxVxP-Motivs ist die Bindungsaffinität an Siah-1 deutlich verringert und ein normaler proteasomaler Abbau von Af4 wird verhindert (Oliver et al., 2004). Im Vergleich zu gesunden Mäusen können 2-3fach höhere Af4-Level nachgewiesen werden, was die „*robotic mouse*“ zu einem potenten AF4-Überexpressionsmodell macht (Bitoun et al., 2007).

Bitoun und ihre Kollegen konnten 2007 aufgrund von Untersuchungen an der „*robotic mouse*“ belegen, dass Af4 zusammen mit anderen Proteinen einen Komplex bildet. Sie untersuchten die Rolle von Af4 im Komplex und konnten dabei zeigen, dass Af4 einen bedeutenden Einfluss auf die Regulation der Gentranskription während der Elongationsphase hat. Af4 beeinflusst positiv die Kinase-Aktivität von P-TEFb und stimuliert auf diese Weise die transkriptionelle Elongation der RNA-Polymerase II. Außerdem vermittelt Af4 über die Interaktion mit Af10 und Enl bzw. Af9 die Dot1-abhängige Methylierung des Histons H3 am Lysin 79 und sorgt so für eine offene

² Ataktischer Gang: unsicherer, eckiger, schwankender Gang;

Ataxie: verwackelte oder verzerrte Bewegungsabläufe. Das Zittern und die Ungerichtetheit der Bewegung wird meistens durch eine Schädigung des Kleinhirns verursacht, das für die Feinabstimmung der Bewegung zuständig ist

Chromatinstruktur. Generell ist die Rekrutierung von DOT1L ubiquitär mit aktiver Transkription assoziiert und führt zu einer Anreicherung der H3K79 Di- und Tri-Methylierung in den Promotorbereichen der Gene (Steger et al., 2008, Jones et al., 2008). All dies erleichtert der Polymerase II den Übergang in ihre produktive elongierende Form und ihr Ablesen des DNA-Templates bei offenem Chromatin (Bitoun et al., 2007). Folgendes Modell der transkriptionellen Elongation in Anwesenheit des AF4-Komplexes wurde postuliert und wird nun mittels Abbildung 2-8 ausführlicher erklärt:

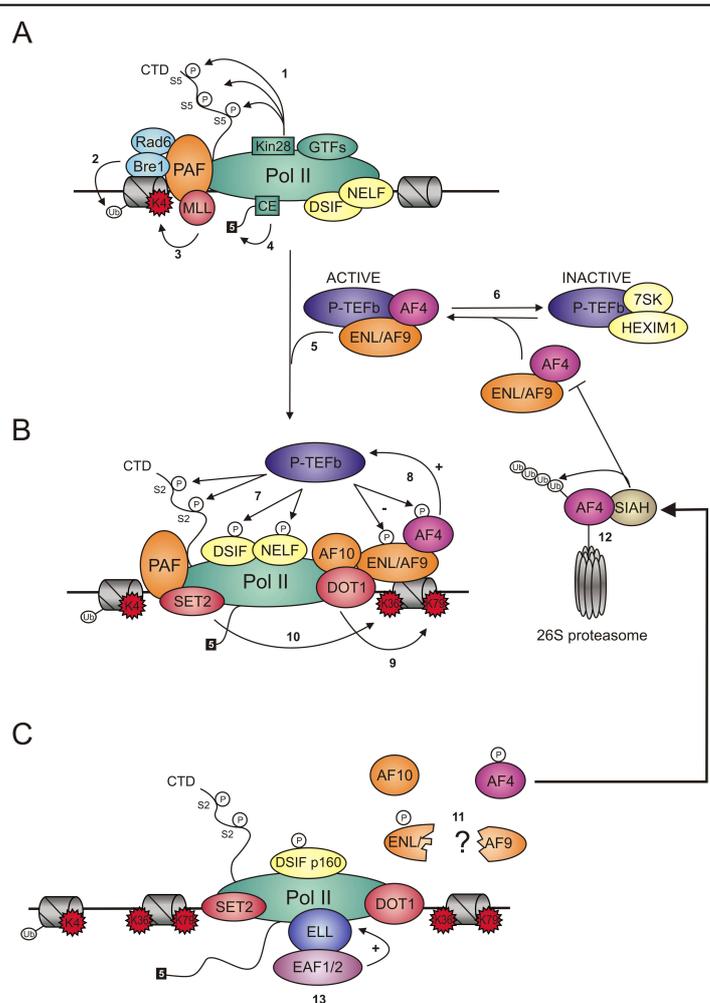


Abbildung 2-8: Modell der durch AF4 stimulierten transkriptionellen Elongation der RNA-Pol II und die resultierende vermittelte Umformung der Chromatinstruktur in eine offene Konformation (aus Bitoun et al., 2007). Die einzelnen Schritte und Abkürzungen werden im umliegenden Text näher erläutert.

(A) [1] Nach der Formation des Pre-Initiationskomplexes, der sich aus der Polymerase II (Pol II) und generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs) zusammensetzt, initiiert Kin28 die Elongation durch Phosphorylierung des Polymerase-CTD-Schwanzes am Serin 5 (S5). Daraufhin wird der PAF-Komplex an die Polymerase II rekrutiert und löst die Ubiquitylierung des Lysin 123 am Histon H2B aus [2]. Dies führt lokal zu einem Bruch der Nukleosomen. PAF rekrutiert währenddessen den MLL-Komplex, was zu einer H3K4 Methylierung des Promotors führt [3]. Die negativen Elongationsfaktoren DSIF und NELF sind auch mit der Polymerase II assoziiert und fördern gemeinsam ihre Arretierung in diesem noch inaktiven Zustand indem sie das Abdecken des 5'-mRNA-Endes durch das *Capping* Enzym (CE) garantieren[4].

(B) ENL/AF9 stabilisieren das AF4. P-TEFb – dessen Aktivität abhängt von dem reversiblen Austausch des inaktiven 7SK/HEXIM1-Komplexes gegen das stabilisierte und damit aktivierende AF4 [6] – wird im nächsten Schritt zur RNA-Polymerase II rekrutiert [5] und überwindet dessen transkriptionelle Pause, indem es sie am Serin 2 (S2) des CTD-Schwanzes

phosphoryliert. Ebenso phosphoryliert P-TEFb auch DSIF, NELF [7] und AF4. Erstere werden dadurch aus dem Komplex entbunden, während die Phosphorylierung des AF4s sein transaktivierendes Potential herabsetzt (negativer *Feedback*-Mechanismus der P-TEFb Aktivität [8]). Begleitend dazu assoziiert ENL/AF9 mit dem Histon H3 und rekrutiert AF10. Dieses Zusammenspiel vermittelt wiederum die Anlagerung von DOT1 an die elongierende Polymerase, was eine Dot1-abhängige H3K79 Methylierung zur Folge hat [9]. SET2 ersetzt den MLL-Komplex und methyliert das Histon H3 am Lysin 36 [10]. Nun liegt eine komplett offene Chromatinstruktur vor, die der RNA-Polymerase II das Ablesen des DNA-Templates erleichtert. **(C)** Auch ENL/AF9 wird von P-TEFb phosphoryliert [8], was zu dessen Abbau führt [11]. AF4 ist nun der Polyubiquitinylierung durch SIAH ausgesetzt und wird dem proteasomalen Abbau zugeführt [12]. Währenddessen methylieren DOT1 und SET2 den Rest des Gens und EAF1/2 stimuliert die ELL-Aktivität [13]. Zusammen mit DSIFp160 wandern sie mit der RNA-Polymerase II mit und steigern ihre Produktivität.

2.4 Die Fusionsproteine AF4•MLL (der4) und MLL•AF4 (der11)

Bislang ist der genaue molekulare Mechanismus der Leukämie-Entstehung durch *MLL*-Translokationen noch nicht hinreichend aufgeklärt. Chromosomale Translokationen des *MLL*-Gens führen in der Regel zur Bildung von zwei *MLL*-Fusionsproteinen, die in leukämischen Blasten nachweisbar sind und onkogenes Potential besitzen. Sie sind in der Lage an veränderte Zielgene zu binden und können die Entwicklung von Stamm- und Vorläuferzellen stark beeinträchtigen, was zu einer fehlerhaften Zellproliferation und letztendlich zu einer akuten myeloischen (AML) oder akuten lymphatischen Leukämie führt (ALL; Cleary et al., 1991; Rabbitts et al., 1991). Grundsätzlich kann bei *MLL*-Translokationen immer ein Fusionsprotein nachgewiesen werden, dass sich aus dem N-Terminus von *MLL* und dem C-Terminus des Fusionspartners zusammensetzt. Aus diesem Grunde wurde von J. Rowley 1992 angenommen, dass für die t(4;11)-Leukämieentstehung das MLL•AF4 (der11) das biologische Onkogen darstellt (Rowley et al., 1992). Diese These wurde auch noch durch die Beobachtung unterstützt, dass nicht in allen Patienten mit einer t(4;11)-Leukämie das reziproke AF4•MLL-Fusionsprotein (der4) nachweisbar ist. Lediglich in 80% der t(4;11)-Patienten konnten beide Fusionsproteine nachgewiesen werden, wobei mittlerweile für die verbleibenden 20% festgestellt werden konnte, dass es zu komplexen Rearrangements kommt, die das *MLL*-, *AF4*- und schließlich noch ein drittes Partner-Gen betreffen (Kowarz et al., 2007). Somit exprimieren eigentlich alle t(4;11)-Patienten zwei Fusionsallele.

Für einige MLL-Fusionsproteine konnte bereits in genetisch modifizierten hämatopoetischen Stammzellen der Maus nachgewiesen werden, dass sie eine myeloische Transformationsfähigkeit vermitteln (Corral et al., 1996; Lavau et al., 1997; Slany et al., 1998; DiMartino et al., 2000; Lavau et al., 2000). Hierbei handelte es sich aber fast ausschließlich um MLL-Fusionen mit einem nukleären Protein. Aber auch MLL-Fusionen mit cytosolischen Proteinen (MLL-GAS7 oder MLL-SEPT6) sind in Tiermodellen in der Lage, einen AML-Phänotyp auszulösen (So et al., 2003; Ono et al., 2005). Für erstere MLL-Fusionsproteine wird angenommen, dass das onkogene Potential der Fusionsproteine von den funktionellen Domänen beider Proteine abhängt. Für die cytosolischen MLL-Fusionsproteine wird vermutet, dass eine Di- oder Oligomerisierung des MLL-N-Terminus mit Hilfe der Interaktionsdomänen des Fusionspartners für das onkogene Potential verantwortlich ist. In beiden Fällen kommt es zu einer ektopischen transkriptionellen Aktivierung von *Hoxa7*, *Hoxa9* und *Meis1* (DiMartino et al., 2002; Ayton & Cleary, 2003; Martin et al., 2003; So et al., 2003; Eguchi et al., 2004; Zeisig et al., 2004).

2.4.1 Das Fusionsprotein MLL•AF4 (der11)

Das Fusionsprotein MLL•AF4 (der11) setzt sich aus dem N-terminalen Teil von MLL und dem C-terminalen Teil des AF4-Proteins zusammen. Es beinhaltet deshalb die MEN1-Bindestelle, die AT-Haken, die subnukleären Lokalisationssequenzen SNL1 und SNL2 und die MT-Domäne des MLL-Proteins, während es im C-Terminus einen Teil der ALF-Domäne, die Prolin-Serin-reiche Region (pSer), die Kernlokalisationssequenz (NLS) und die C-terminale Homologiedomäne (CHD) vom AF4-Protein besitzt.

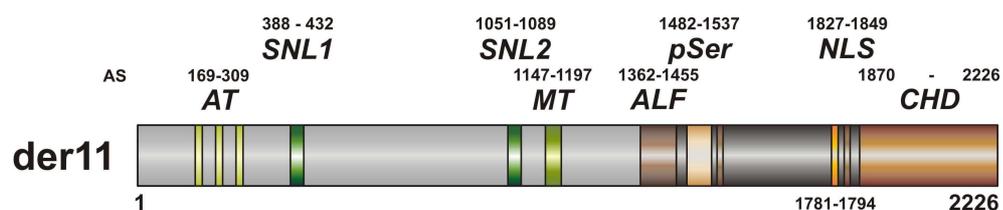


Abbildung 2-9: Schematische Darstellung des der11-Fusionsproteins mit den funktionellen Domänen

Die Aminosäuren geben die Bereiche der Domänen im der11-Protein an. Die Abkürzungen der Domänen wurden bereits im Kapitel 2.3.2/ in Abbildung 2-4 und Abbildung 2-6 näher erläutert.

Wie bereits erwähnt, wird das der11-Protein als das entscheidende Onkogen der t(4;11)-Leukämie angesehen. Dementsprechend wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, um die Eigenschaften des der11-Proteins näher zu beleuchten. Obwohl in t(4;11)-Zellen eine ektopische transkriptionelle Aktivierung von *Hoxa7*, *Hoxa9* und *Meis1* nachgewiesen werden konnte (Ayton & Cleary, 2003; Zeisig et al., 2004), zeigten Bertrand und seine Kollegen, dass die

Expression des MLL•AF4-Proteins keinen Einfluss auf die *Hox*-Genexpression hat (Bertrand et al., 2003). Transfektions-Experimente mit einem induzierbaren MLL•AF4 Fusionskonstrukt zeigten allerdings einen dosisabhängigen Effekt auf das Fortschreiten des Zellzykluses (Caslini et al., 2004). Mit steigender Menge an MLL•AF4 in den Zellen nahm die Wachstumsrate ab und die Zellen akkumulierten in der G1-Phase. Außerdem erwiesen sich die MLL•AF4-Zellen bei der Etoposidbehandlung als Apoptose-resistenter im Vergleich zu normalen gesunden Zellen (Caslini et al., 2004; Gaussmann et al., 2007). Bereits 1998 stellten Kersey und seine Kollegen fest, dass t(4;11)-Zellen die höchste Resistenz gegenüber Arzneimittel-induzierter Apoptose aufweisen im Vergleich zu Zellen mit anderen leukämischen Fusionsgenen (Kersey et al., 1998). 2005 führte ein *knock-down* von MLL•AF4 in Zellen der t(4;11)-Zelllinie SEM mittels siRNA zu einem starken Anstieg der Apoptose (Thomas et al., 2005). Allerdings konnte hier, im Gegensatz zu Bertrand et al., ein Einfluss des MLL•AF4-Proteins auf die Expression von *HOXA7*, *HOXA9* und *MEIS1* nachgewiesen werden. Die Herunterregulierung des MLL•AF4-Proteins führte zu einer Reduktion der Expression dieser Gene. Weitere Untersuchungen zeigten zudem einen Einfluss von MLL•AF4 – wie auch MLL – auf den CDK-Inhibitor p27 (Milne et al., 2005; Xia et al., 2005). MLL•AF4 führt über eine direkte Bindung an den Promotor – wahrscheinlich vermittelt über die Interaktion mit MENIN – zu einer Überexpression von p27 in lymphoiden Zellen. Dieser Einfluss des MLL•AF4-Fusionsproteins auf den Zellzyklus könnte möglicherweise einen Erklärungsansatz liefern für die Resistenz leukämischer t(4;11)-Stammzellen während der Chemotherapie.

2006 wurden zwei verschiedene transgene *Mll•Afl4*-Mausmodelle mittels der „*inventor*“-Technologie bzw. mittels einer *knock-in* Strategie etabliert (Chen et al., 2006; Metzler et al., 2006). In beiden Fällen entwickelten die Mäuse nach einer sehr langen Latenzzeit einen B-Zell-Lymphom-Phänotyp mit geringer Penetranz – jedoch keine ALL. Eine etwas andere *knock-in* Strategie, bei dem das *Mll•Afl4* unter der Kontrolle des endogenen *Mll*-Promotors steht, führte zur Entwicklung einer preB-ALL oder einer AML (Krivtsov et al., 2008). Bei dieser Studie konnte auch eine *Mll•Afl4*-abhängige ektopre H3K79-Dimethylierung in humanen und murinen Zellen nachgewiesen werden. Diese H3K79me² ist wichtig für die Aufrechterhaltung der *Mll•Afl4*-abhängigen Genexpression und scheint ein Differenzierungsmerkmal muriner und humaner t(4;11)-abhängiger ALLs darzustellen.

Andere Untersuchungen ergaben, dass in t(4;11)-positiven Zellen verschiedene mikro-RNAs (miRNAs) hochreguliert waren (Nakamura et al., 2007). MiRNAs sind kurze RNAs (20 – 22 Nukleotide lang), die auf posttranskriptioneller Ebene, aufgrund von gezielter Basen-Paarbildung mit der 3'UTR von mRNAs (messenger RNA), die Genexpression negativ beeinflussen können. Sie sind evolutionär konserviert und regulieren eine ganze Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Wegen. Sie sind unter anderem am Zellzyklus beteiligt und spielen eine

Rolle bei der Zellproliferation und bei der Tumorgenese (Bartel et al., 2004). Die Fehlregulation der miRNAs in t(4;11)-positiven Zellen konnte mittels IP-Experimente auf eine Interaktion von Mll•Af4 mit dem Protein Drosha zurückgeführt werden, während eine Interaktion für das native Mll nicht gezeigt werden konnte. Drosha verrichtet den initialen Schritt der miRNA-Prozessierung im Zellkern. Eine Überexpression bestimmter miRNAs kann vermutlich auf die Rekrutierung von Drosha durch Mll•Af4 zurückgeführt werden. Nakamura und Kollegen erzielten außerdem die gleichen Resultate mit dem Mll•Af9-Fusionsprotein. Somit bleibt die Frage offen, ob es sich hier um eine generelle Interaktion von Drosha mit Mll-Fusionsproteinen handelt, oder ob sie spezifisch für diese beiden Mll-Fusionsproteine ist. Ein neuer Bericht von Wang und Blelloch geht auf die Rolle von miRNAs als Regulatoren embryonaler Stammzellen ein (Wang & Blelloch, 2009). Embryonale Stammzellen besitzen eine einzigartige Zellzyklus-Struktur, die es den Zellen ermöglicht, schnell die G1-Phase zu durchlaufen und in die S-Phase überzugehen. MiRNAs unterdrücken verschiedene Inhibitoren des G1/S-Übergangs und erhalten damit diesen besonderen Zellzyklus. Sobald die Zellen differenzieren und ihre G1-Phase ausweiten, sinkt die Expression dieser miRNAs rapide. MiRNAs sind somit sehr interessante Targets, deren Bedeutung in der Krebsforschung noch genauer untersucht werden muss.

2.4.2 Das Fusionsprotein AF4•MLL (der4)

Das reziproke AF4•MLL (der4) setzt sich aus dem N-terminalen Teil von AF4 und dem C-terminalen Teil von MLL zusammen. Demnach beinhaltet es vom AF4-Protein die NHD- und den vorderen Teil der ALF-Domäne mit der SIAH-Erkennungssequenz. Vom MLL-Protein besitzt das der4-Protein die Bromodomäne, die PHD-Motive, die Transaktivierungsdomäne, die SET-Domäne, die Interaktionsdomänen FYRN/FYRC und die beiden Taspaseschnittstellen CS1 und CS2. Folglich kann also auch das AF4•MLL-Protein von der Taspase1 proteolytisch gespalten werden und über die beiden intramolekularen Interaktionsdomänen FYRN/FYRC dimerisieren. Die Interaktion der beiden Peptidfragmente der4•N (p178) und der•C (auch MLL•C, p134) stabilisiert den der4-Komplex und führt dazu, dass zwar, aufgrund des SIAH-Erkennungsmotivs, eine Bindung von SIAH an AF4•MLL stattfindet, aber der proteasomale Abbau verhindert wird. Das ungeschnittene AF4•MLL-Protein wird effektiv von SIAH erkannt und gebunden und dem proteasomalen Abbau zugeführt. Bursen und ihre Kollegen konnten 2004 zeigen, dass sich das AF4•MLL-Fusionsprotein nach der Spaltung durch Taspase1 in ein Onkoprotein verwandelt. Es kommt zur Akkumulation von AF4•MLL in den Zellen, was wiederum zur Wachstumstransformation der Zelle führt (Bursen et al., 2004).

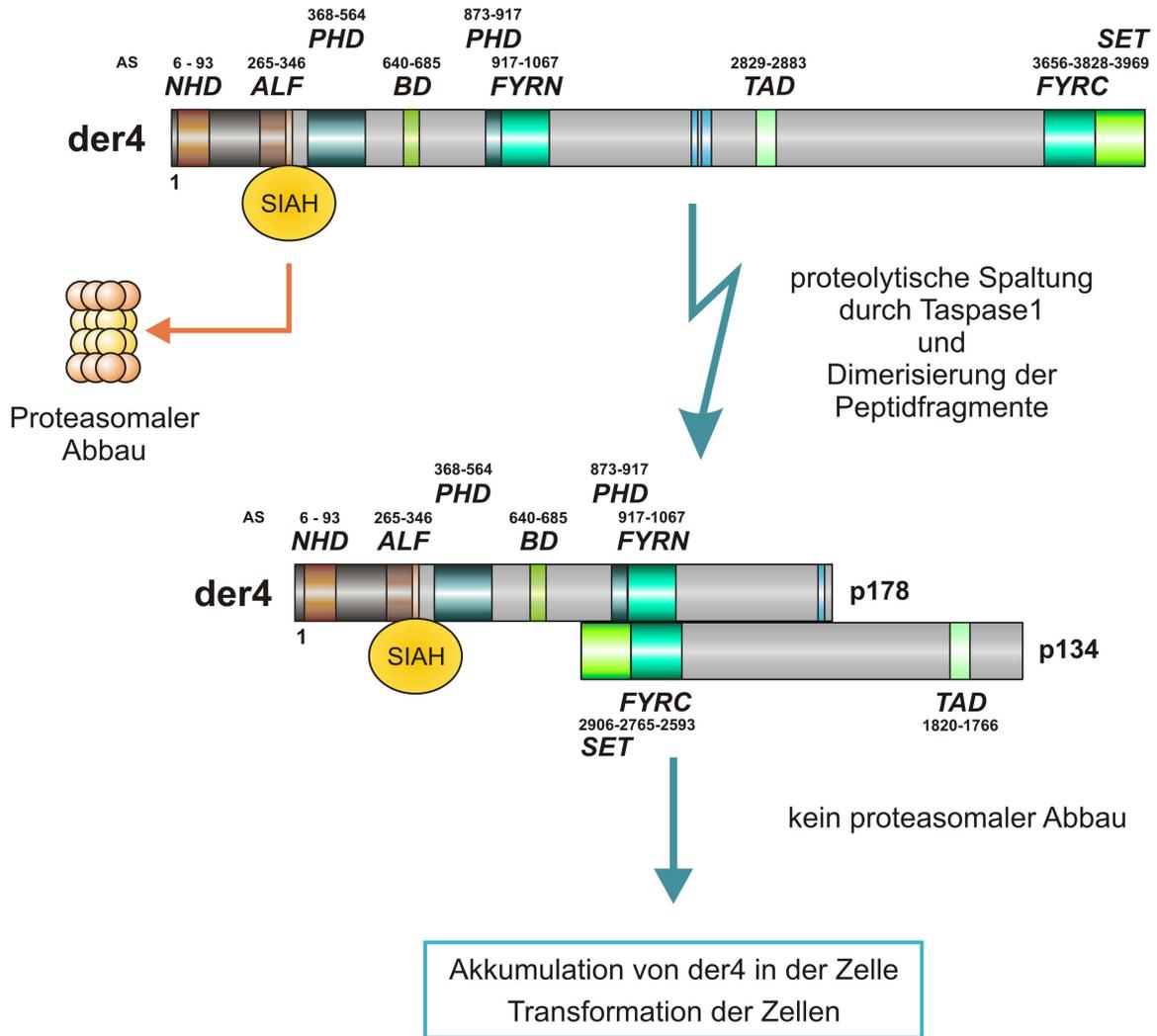


Abbildung 2-10: Schematische Darstellung des pathologischen Mechanismus des der4-Fusionsproteins
 Abgebildet ist der schematische Aufbau des der4-Proteins mit seinen funktionellen Domänen. Die Abkürzungen der Domänen wurden bereits im Kapitel 2.3.2/ in Abbildung 2-4 und Abbildung 2-6 näher erläutert. Der onkogene Prozess wurde bereits im Text erläutert.

Das wachstumstransformierende Potential konnte *in vitro* in stabil transfizierten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF-*in vitro*-Zellen) bestätigt werden. AF4•MLL-transfizierte Zellen wiesen einen Verlust der Kontaktinhibition auf und zeigten eine erhöhte Zellwachstumsrate (Gaussmann et al., 2007). Zudem zeigte sich erneut, dass das MLL•AF4-Fusionsprotein den Zellen eine Apoptose-Resistenz verleiht. MEF-Zellen mit beiden Fusionsallelen hingegen, zeigten im Vergleich die höchste Apoptose-Resistenz, den Verlust der Kontaktinhibition und eine starke Proliferation der Zellen. Damit vereinen diese Zellen die Eigenschaften der einzel-transfizierten Zellen. Sie erhielten aber auch noch zusätzliche Eigenschaften, die in den einzel-transfizierten Zellen nicht beobachtet werden konnten. Eine interessante Entdeckung war die Hochregulation von Nanog in diesen Zellen. Nanog ist ein Homeobox-Protein das zusammen mit den Proteinen Oct4 und Sox2 den Stammzell-Charakter von Zellen aufrechterhält.

Ganz aktuell wird die Rolle von AF4•MLL bei der t(4;11)-Leukämie in retroviralen Transduktions-/Transplantations-Experimenten im Arbeitskreis von Prof. Marschalek untersucht. Murine hämatopoetische Stammzellen wurden mit den Fusionsallelen *AF4•MLL*, *MLL•AF4* oder beiden zusammen transduziert und in Mäuse transplantiert. Es konnte gezeigt werden, dass das *AF4•MLL*-Transgen alleine den Ausbruch einer Leukämie verursachen konnte. Die Mäuse entwickelten eine B/T-biphänotypische akute Leukämie oder eine proB-ALL. Die Mäuse mit beiden Fusionsallelen hingegen, entwickelten eine *mixed lineage leukemia* (MLL) und die alleinige Transduktion von *MLL•AF4* konnte keine Leukämie in Mäusen auslösen (Bursen et al., 2009 eingereicht). Diese Untersuchungen deuten demnach darauf hin, dass beide Fusionsproteine zum Phänotyp einer t(4;11) Leukämie beitragen, und dass das *AF4•MLL*-Fusionsallel eine wesentliche Rolle dabei spielt.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wird der Name der4 für das AF4•MLL-Fusionsprotein verwendet.

2.5 Massenspektrometrie zur Analyse von Proteinen

2.5.1 Grundlagen der Massenspektrometrie

Eine zentrale Rolle in den Biowissenschaften stellt die Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen dar. Die Aminosäuresequenz eines Proteins liefert die Verbindung zwischen dem Protein und seines kodierenden Gens und verbindet ganz prinzipiell die Zellphysiologie mit der Genetik. Die Identifizierung von Proteinen und Proteininteraktionen ermöglicht somit einen Einblick in komplexe zelluläre Netzwerke und erweitert damit unser Verständnis, wie das Leben überhaupt funktioniert.

In den letzten zwei Jahrzehnten ist die Massenspektrometrie zu einer der wichtigsten Methoden in der Bioanalytik geworden. Die Charakterisierung von Biomolekülen mit Hilfe der Massenspektrometrie ist seit den 90er Jahren ein essentielles Werkzeug der Proteom-Forschung. Den Grundstein legten Ende der 80er Jahre zwei neue schonende Ionisierungstechniken: die Matrix-unterstützte Laser-Desorption und -Ionisation (MALDI, „*matrix assisted laser desorption/ionization*“) (Karas, 1985, Karas 1987, Karas und Hillenkamp, 1988) und die Elektrospray Ionisation (ESI, „*electrospray ionization*“) (Fenn, Mann et al., 1989). Sie lösten das Problem, Ionen aus großen nichtflüchtigen Biomolekülen wie Proteinen und Peptiden zu generieren.

Die bis dahin eingesetzten Ionisierungstechniken, wie Elektronenstoß Ionisation (EI) oder Chemische Ionisation (CI) sind für die Analyse großer polarer Verbindungen, wie Peptide und Proteine nicht geeignet. Bei diesen beiden Methoden wird der Analyt zunächst durch Erhitzen

zum Teil nach Derivatisierung in die Gasphase überführt und dann ionisiert. Diese Zwei-Stufen-Prozesse bedingen eine große thermische Belastung des Analyten und führen somit zur Zersetzung und Bildung von Fragment-Ionen in der Gasphase.

Das Prinzip der Massenspektrometrie beruht auf der Bestimmung der Molekülmasse freier Ionen im Hochvakuum. Der grundsätzliche Ablauf einer massenspektrometrischen Analyse besteht aus drei Schritten:

- (1) Ionisierung und Beschleunigung der Probenmoleküle mit Hilfe einer Ionenquelle.
- (2) Auftrennung der generierten Ionen in einem Massenanalysator nach ihrem Masse/Ladungszahl-Verhältnis (m/z).
- (3) Registrierung der Ionen und ihrer Intensitäten durch einen Detektor. Generierung eines Massenspektrums durch Darstellung der Intensität gegen das Masse-Ladungsverhältnis m/z mittels Computer.

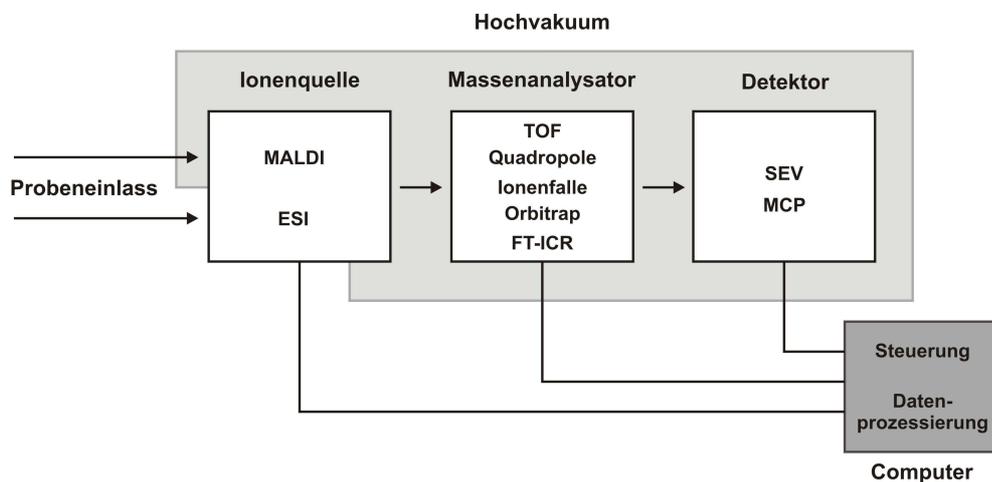


Abbildung 2-11: Komponenten eines Massenspektrometers

Die Vielfalt der Gerätetypen kommt hauptsächlich durch die Variation der drei Funktionselemente zustande. TOF: *time of flight*, FT-ICR: *fourier transform ion cyclotron resonance*, SEV: Sekundärelektronenvervielfacher, MCP: *mirco-channel plate*

2.5.2 MALDI – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation

MALDI beruht auf der Co-Kristallisation des zu untersuchenden Analyten mit einer niedermolekularen organischen Verbindung, der Matrix. Dabei wird der in einem Lösungsmittelgemisch gelöste Analyt mit einem 1.000 bis 10.000 fachen Überschuss an Matrix gemischt und zusammen getrocknet. Man spricht dann von einer „*dried-droplet*“ Präparation (Karas et al., 1987; Karas & Hillenkamp, 1988). Eine andere Variante ist das Auftragen eines Tropfens der Analytlösung auf einen zuvor schon getrockneten Matrix-Tropfen („*surface*“ Präparation, Vorm et al., 1994). Nach dem Trocknen wird die Präparation im Hochvakuum der Ionenquelle mit kurzen

Laserimpulsen (3 ns) bestrahlt. Üblicherweise werden UV-Laser mit einer Wellenlängen von 337 nm (N₂-Laser) oder 355 nm (Nd:YAG-Laser) verwendet. Die Matrix absorbiert dabei die Laserenergie und es kommt zur Ablösung einer dünnen Oberflächenschicht gefolgt von der Freisetzung gasförmiger Matrix- und Analytmoleküle und deren partieller Ionisation. Die geringe thermische Belastung des Analyten während dieses Prozesses ermöglicht eine fragmentierungsarme Ionisation, bei der für Peptide und Proteine mehrheitlich einfach geladene Analytionen vom Typ $[M+H]^+$ entstehen (Karas et al., 2000). Der Mechanismus der Ionisation wurde erst kürzlich von Jaskolla et al., 2008 aufgrund der Entwicklung einer neuen Matrix näher beleuchtet. Nach Jaskolla et al. hängt die Ausbeute an geladenen Analytionen von der Protonenaffinität der Matrix und der Überlebensrate der Analytionen, den „*lucky survivors*“ (Karas et al., 2000; Karas & Kruger, 2003) in der Gasphase, ab (Jaskolla et al., 2008; Jaskolla & Karas, 2008). Demnach kommt es nach dem Laserbeschuss – nachdem sich die Matrix-Analyt-Kristalle abgelöst und sich im Vakuum als Matrix-Analyt-Wolke ausbreiten – zu unzähligen Kollisionen zwischen den Analytmolekülen und den vielen Matrixmolekülen. Dabei findet ein Protonentransfer der Matrix auf das Analytmolekül statt. Je niedriger nun die Protonenaffinität der Matrix ist, desto leichter protoniert diese den Analyten. Natürlich kann es durch Kollision auch wieder zur Deprotonierung und damit Neutralisation kommen. Deshalb ist die Ausbeute auch von der Überlebensrate der Analytionen, den „*lucky survivors*“, abhängig.

In Abhängigkeit von der Natur des Analyten gibt es für die MALDI-Präparation verschiedene Matrices. Ihr gemeinsames Strukturmerkmal ist der aromatische Ring, der für die Absorption der Laserenergie verantwortlich ist.

Abkürzung	Vollständiger Name	Anwendung	Literatur
SA (Sinapinsäure)	4-Hydroxy-3,5-dimethoxyzimtsäure	Proteine > 10 kDa	Beavis et al., 1989
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure	Peptide, Proteine, Phosphorylierungen	Strupat et al., 1991
HCCA	α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure	Peptide, Proteine	Beavis et al., 1992
HPA	3-Hydroxypicolinsäure	Oligonucleotide	Taranenko et al., 1994
CICCA	α -Cyano-4-chlorozimtsäure	Proteine, Peptide	Jaskolla et al., 2008

Tabelle 2-2: Verbreitete MALDI-Matrices für Biomoleküle

Alle Matrizes unterscheiden sich in ihrem Kristallisationsverhalten und damit in ihrer Fähigkeit, den Analyten einzuschließen. So bildet DHB im Vergleich zu HCCA inhomogene Kristallnadeln aus, wodurch die Reproduzierbarkeit und Verlässlichkeit der Messung vermindert wird. Dafür erweist sich DHB aber als die bessere Matrix, wenn es um die Messung von Phosphopeptiden geht. Für die Peptidanalytik bei der Proteinidentifikation wird HCCA als Standardmatrix eingesetzt. Sie kristallisiert homogen und hat den Vorteil, dass sie nach dem Trocknen mit 5%-iger Ameisensäure gewaschen werden kann. Die Konzentration an störenden Salzen wird dadurch reduziert. Sinapinsäure findet Anwendung bei intakten Proteinen und großen Molekülen.

Ein Vorteil der MALDI-Methode ist ihre hohe Toleranz gegenüber anorganischen und organischen Verunreinigungen. Viele der Puffer, Detergenzien und Salze von biochemischen Methoden (z.B. Zellyse, Gelelektrophorese, tryptischer Verdau) vor der MS-Analyse stören in ihrer üblichen Arbeitskonzentration die Messung kaum oder gar nicht. So tolerieren Sinapinsäurepräparationen bis zu 200 mM Glycerol, HEPES, Tris, Ammoniumacetat oder Ammoniumhydrogencarbonat und mit DHB als Matrix können noch Proteinlösungen mit bis zu 10% SDS analysiert werden (Strupat et al., 1992).

2.5.3 MALDI-TOF (time of flight)

Aufgrund der gepulsten Ionenerzeugung eignet sich eine MALDI-Ionenquelle ideal für eine Kopplung an ein Flugzeit-Massenspektrometer (engl. *time of flight*). Das Prinzip der Flugzeitmessung basiert auf der Bestimmung der Flugzeit von Ionen auf einer feldfreien Flugstrecke. Dazu werden die in der Ionenquelle gebildeten Ionenpakete in einem Potentialgefälle beschleunigt. Wegen der unterschiedlichen Masse m besitzen die einzelnen Ionen unterschiedliche kinetische Energien E_{kin} und damit unterschiedliche Geschwindigkeiten v . Die gebildeten Ionenpakete werden somit während des Fluges durch eine feldfreie Driftstrecke im Flugrohr in Abhängigkeit ihres Masse-Ladungsverhältnisses aufgetrennt.

Aus der Formel für die kinetische Energie

$$E_{kin} = \frac{1}{2} \cdot m \cdot v^2 = z \cdot e \cdot U_{acc}$$

gelangt man durch einsetzen von $v = L/t$ (L = Länge der Driftstrecke, t = Zeit) und Umformung zu folgender Gleichung:

$$m/z = (2 \cdot e \cdot U_{acc} / L^2) \cdot t^2$$

Es wird deutlich, dass das Masse-Ladungsverhältnis m/z proportional zum Quadrat der Flugzeit t ist. Ein Ion mit höherer Masse wird damit längere Zeit zum Durchfliegen der feldfreien Driftstrecke benötigen als ein Ion mit niedrigerer Masse.

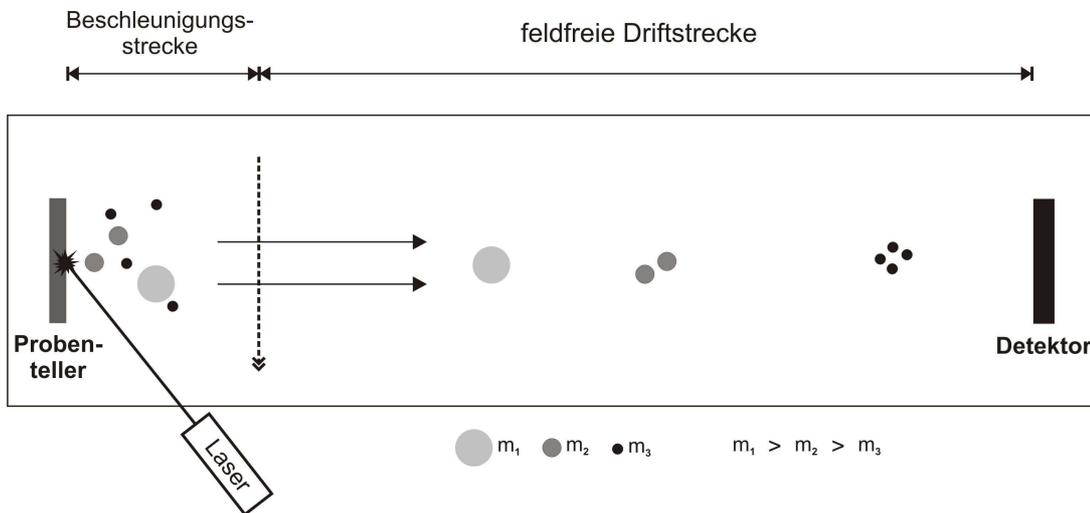


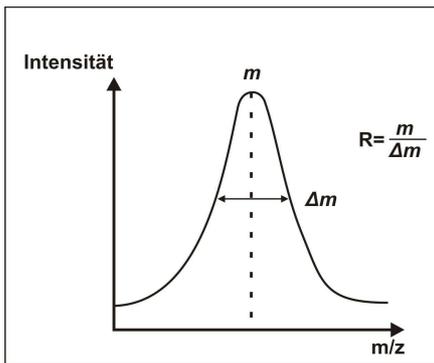
Abbildung 2-12: Schematische Darstellung eines linearen Flugzeitmassenspektrometers

Die Analyten mit größerer molekularer Masse benötigen eine längere Zeit zum Durchqueren der feldfreien Driftstrecke.

Ein Problem der TOF-Analysatoren ist, dass Ionen mit gleicher Masse mit einer gewissen Energieverteilung starten. Diese Energieverteilung beruht auf leichten Orts- und Geschwindigkeitsunschärfen bei der Ionisierung. Diese Unschärfen sind wiederum bedingt durch Unterschiede im Standort, in der Startgeschwindigkeit oder der Kollision mit anderen Ionen. Dadurch kommt es zu deutlich unterschiedlichen Flugzeiten für Ionen mit gleicher Masse. Dies trägt zur Peakverbreiterung der Ionensignale bei und führt somit zu einer schlechten Auflösung.

Das Auflösungsvermögen R ist eine wichtige Eigenschaft eines Massenanalysators. Es ist definiert als der Quotient der Masse m und der Differenz Δm , mit der ein weiteres Ion der Masse $m + \Delta m$ von m unterschieden werden kann.

$$R = m / \Delta m = m_1 / (m_2 - m_1)$$



Bei Flugzeitmassenspektrometern wird traditionell das Auflösungsvermögen aus einem einzigen Peak bestimmt. In diesem Falle wird Δm als die Halbwertsbreite FWHM (engl. *full width at half maximum*) des Peaks definiert, d.h. bei 50% der Gesamtpeakhöhe.

Abbildung 2-13: Das Auflösungsvermögen R

Eine wesentliche Verbesserung des Auflösungsvermögens wird durch den Einsatz eines Reflektors erreicht (Mamyrin et al., 1973). Dieser Reflektor erzeugt ein zweites elektrisches Feld, das der Flugrichtung entgegengesetzt ist. Ionen mit gleicher Masse, aber unterschiedlicher kinetischer Energie, dringen unterschiedlich tief in das elektrische Feld ein und werden dann in die entgegengesetzte Richtung ihrer ursprünglichen Flugbahn beschleunigt. Ionen mit höherer kinetischer Energie dringen tiefer in das elektrische Feld ein und kompensieren damit ihre kürzere Laufzeit in der feldfreien Driftstrecke. Bei richtiger Wahl der Reflektorspannung erreichen die Ionen zur gleichen Zeit den Detektor.

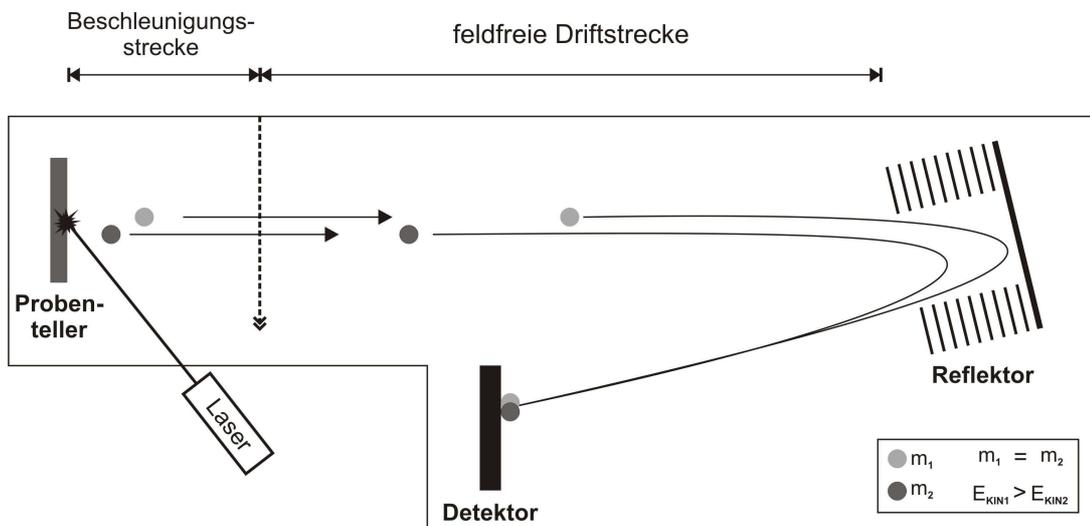


Abbildung 2-14: Schematische Darstellung eines MALDI-TOF-Massenspektrometers mit Reflektor

Mit Hilfe des Reflektors werden zwei Ionen mit gleicher Masse aber unterschiedlicher kinetischer Energie auf den Detektor fokussiert.

Eine weitere Möglichkeit, um das Auflösungsvermögen zu verbessern, ist die verzögerte Ionenextraktion (*delayed extraction, DE*; Brown et al., 1995). Die Verteilung der Anfangsgeschwindigkeiten der Ionen in der MALDI-Ionenquelle wird dadurch korrigiert. Bei dieser Methode wird das elektrische Beschleunigungsfeld zeitverzögert zum Laserimpuls eingeschaltet. In Abhängigkeit vom Massenbereich werden Verzögerungszeiten von 50 - 1000 ns verwendet.

Ionen mit einer höheren Startgeschwindigkeit entfernen sich weiter von der Probenoberfläche und erfahren, nach dem Einschalten des elektrischen Feldes, eine geringere kinetische Energie als Ionen mit gleicher Masse aber geringerer Startgeschwindigkeit.

Durch Kombination beider Komponenten können in modernen MALDI-TOF-Instrumenten Auflösungen von bis zu 30.000 und eine Massengenauigkeit von 5 – 10 ppm erreicht werden. Dies gilt allerdings nur für einen Massenbereich zwischen 1 und 5 kDa.

2.5.4 MALDI-TOF-PSD

Möchte man Informationen zur Struktur der ursprünglichen Analytione erhalten, so muss das gewünschte Ion fragmentiert werden. In MALDI-Massenspektrometern wird die Sequenzierung von Biomolekülen, wie beispielsweise Peptiden, mittels PSD (engl. *post source decay*) oder durch eine kollisionsinduzierte Fragmentierung (engl. *collision induced dissociation; CID*) erreicht.

Obwohl die MALDI-Methode als eine schonende Ionisierungstechnik beschrieben wird, kommt es zur Bildung von Fragment-Ionen. Dabei können sich Fragment-Ionen direkt in der Quelle unmittelbar beim Ionisierungsprozess selbst bilden (prompte Fragmentierung, engl. *in source decay*), oder sie entstehen nach dem Beschleunigungsprozess in der feldfreien Driftstrecke. Dann spricht man von einer metastabilen Fragmentierung oder auch von PSD (engl. *post source decay*). Dieses Phänomen wurde erstmals von Kaufmann und Spengler beschrieben (Spengler et al., 1992; Kaufmann et al., 1993; Spengler et al., 1997). Das Analytione – oder in diesem Fall auch Vorläufer-Ion (engl. *precursor*) genannt – zerfällt dabei in ein geladenes und in ein neutrales Fragment. Die Häufigkeit solcher Zerfälle liegt typisch zwischen 10 und 50%. Das Vorläufer-Ion und seine Fragmente fliegen nun mit der gleichen Geschwindigkeit weiter und lassen sich deshalb prinzipiell in einem linearen Flugzeitmassenspektrometer nicht voneinander trennen. Da die Fragmente jedoch eine andere Masse haben als das Vorläufer-Ion und damit eine andere kinetische Energie, lassen sie sich mit Hilfe eines Reflektors trennen. Ungeladene Fragmente werden dabei vom Reflektor nicht abgelenkt und treffen deshalb nicht auf den Detektor. Die geladenen leichten Fragmente dagegen dringen weniger tief in den Reflektor ein als das geladene Vorläufer-Ion. Dadurch erreichen sie früher den Detektor und ergeben ein Signal.

Leider besitzen die meisten Fragment-Ionen, eine zu geringe kinetische Energie und werden deshalb bei konstanter Reflektorspannung zu früh abgelenkt und können dann nicht auf die Detektoroberfläche treffen. Auch eine zu große Energiedifferenz zwischen dem Vorläufer-Ion und seinen Fragment-Ionen führt bei Erreichen des Detektors zu einem schlechten Spektrum. Der Reflektor kann die geringe Energie der Fragment-Ionen nicht mehr kompensieren und sie werden dann nur noch als breites Signal im unteren Massenbereich registriert. Die Lösung ist ein

spezieller Reflektor mit variabler Spannung, der sich der geringen Energie der Fragment-Ionen anpasst. Nun können stufenweise PSD-Spektren aufgenommen werden, indem die Reflektorspannung schrittweise reduziert wird. Die daraus resultierenden Teilspektren können anschließend durch rechnerische Kombination zu einem PSD-Spektrum zusammengesetzt werden. Damit man auch nur das PSD-Spektrum von einem Vorläufer-Ion erhält, muss vor dem Reflektor noch ein *precursor ion selector* (PIS) eingebaut sein. Es handelt sich dabei um eine Elektrode, die den Ionenstrahl ablenkt und nur durch kurzes Abschalten zur richtigen Zeit das gewünschte Vorläufer-Ion mit seinen Fragmenten zum Reflektor passieren lässt.

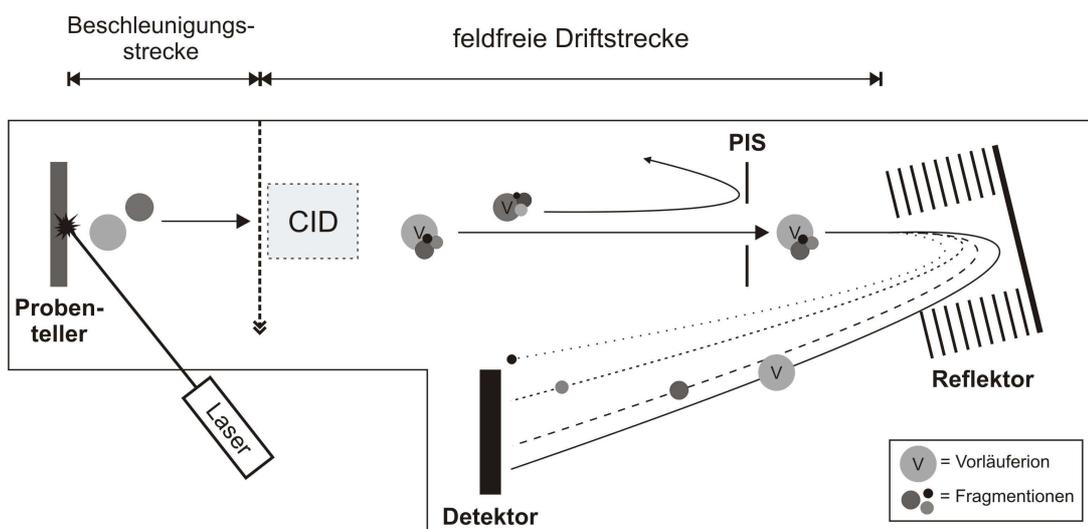


Abbildung 2-15: Schematische Darstellung des Prinzips von MALDI-TOF-PSD

Erläuterungen zum Post Source Decay befinden sich im Text. Die CID-Zelle ist optional (siehe Kapitel 2.5.6).

2.5.5 MALDI-TOF/TOF

Trotz des variablen Reflektors ist die Qualität der Spektren nicht sehr gut, da immer noch eine hohe Energiedifferenz zwischen den Fragment-Ionen und dem Vorläufer-Ion besteht. Außerdem müssen mehrere Teilspektren mit unterschiedlichen Reflektorspannungen aufgenommen werden um ein PSD-Spektrum zu generieren. Dies führt zu einem erhöhten Probenverbrauch und nimmt auch eine gewisse Zeit in Anspruch.

Dank der Weiterentwicklung der MALDI-TOF-PSD-Methode ist es heute möglich, durch Anhebung der Gesamtenergie von selektiertem Vorläufer- und Fragment-Ionen, Massenspektren in einem einzigen Schritt mit deutlich besserer Qualität aufzunehmen. Die Energieunterschiede werden dabei so stark minimiert, dass bei konstanter Reflektorspannung eine optimale Fokussierung des Vorläufer-Ions als auch der Fragment-Ionen auf den Detektor möglich ist. Aufgrund der Anhebung der Energie erfahren die Ionen eine Beschleunigung, die abhängig von

ihrer jeweiligen Masse ist. Die Fragment-Ionen und das Vorläufer-Ion können somit, aufgrund ihrer nun unterschiedlichen Geschwindigkeit, in einem zweiten Flugrohabschnitt getrennt werden. Erst nach dieser Trennung treffen sie auf den Reflektor. Aber auch in diesem zweiten Flugrohabschnitt kommt es zum weiteren Zerfall des Vorläufer-Ions. Diese niederenergetisch metastabilen Fragmente fliegen mit der gleichen Geschwindigkeit des Vorläufer-Ions und würden beim Erreichen des Detektors die Spektrqualität negativ beeinflussen. Deshalb wird vor den Reflektor eine zweite Ablenkelektrode eingebaut, einen so genannten *metastable ion suppressor* (MIS), der nach Passage aller Fragment-Ionen, das Vorläufer-Ion mit seinen metastabilen Produkten durch Anschalten eines elektrischen Feldes ablenkt.

Man spricht hier von einem MALDI-TOF/TOF, weil durch die Beschleunigungszelle (auch LIFT genannt) aus einem Flugrohr zwei gemacht werden. Im ersten TOF findet die Selektion des Vorläufer-Ions und dessen Fragmentierung statt, während im zweiten TOF die Fragmente und das Vorläufer-Ion voneinander getrennt werden.

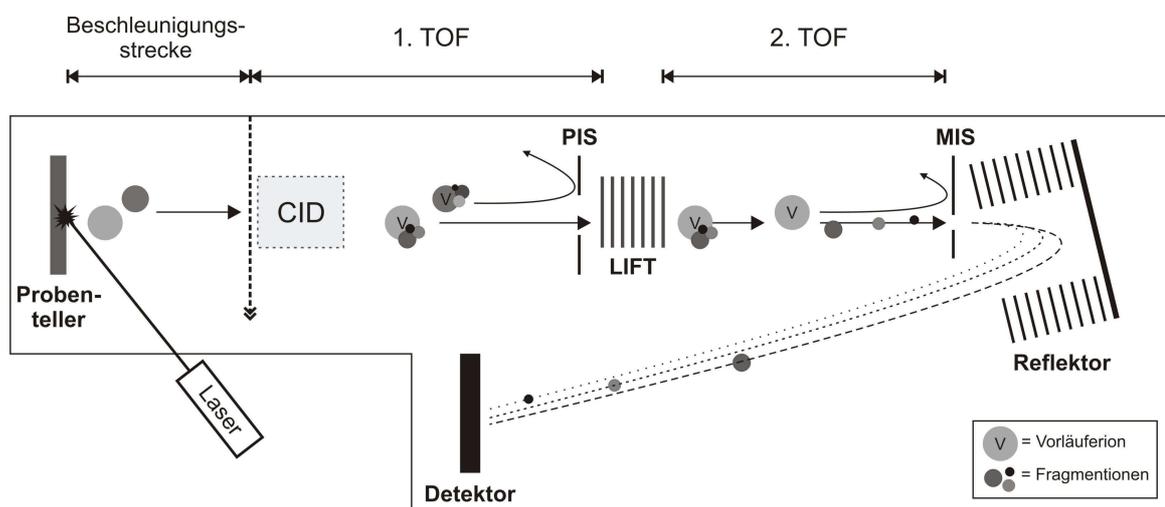


Abbildung 2-16: Schematische Darstellung eines MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometers

Erläuterungen zum MALDI-TOF/TOF befinden sich im Text. Die CID-Zelle ist optional (siehe Kapitel 2.5.6) und kann in ihrer Position von Gerät zu Gerät variieren.

2.5.6 CID – *collision induced dissociation*

Beim CID-Verfahren wird mit Hilfe eines so genannten Stoßgases (Helium, Argon oder auch Luft) ein Analyt in seine Fragmente gespalten. Die beim Stoß übertragene Energie wird in sehr kurzer Zeit in Schwingungsenergie transformiert, was schließlich zu einem Bindungsbruch führt. Bei einem MALDI-TOF-PSD oder TOF/TOF-Gerät kann die CID-Zelle kurz hinter der Quelle eingebaut werden. Man erhält dadurch Fragmente, die beim PSD nicht erzeugt werden. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen low energy CID (ca. 0,1 keV) und high energy CID

(ca. 1-2 keV). Low energy CID wird üblicherweise in Ionenfallen, Triplequadrupol- und Q-TOF-Geräten eingesetzt. Bei MALDI-TOF-PSD und MALDI-TOF/TOF hingegen wird mit hoher Stoßenergie fragmentiert, was vorwiegend zu Produkten mit kleinen m/z -Quotienten führt.

2.5.7 Peptidsequenzierung

Die oben beschriebenen Fragmentierungen führen in der Regel bei Peptiden zu einem Zerfall entlang der Peptidbindung, und es entstehen Fragmente unterschiedlicher Peptidlänge. Die Bezeichnung dieser Fragmente erfolgt nach der Nomenklatur von Roepstorff und Fohlmann (Roepstorff et al., 1984). Verbleibt nach der Spaltung die Ladung am N-Terminus der Peptidkette, so nennt man sie a-, b- oder c-Ion, je nachdem ob der Bindungsbruch vor, in oder nach der Peptidbindung erfolgt. Analog dazu werden die Peptidfragmente mit C-terminaler Ladung als x-, y- oder z-Ion bezeichnet. Ein zusätzlicher Index gibt die Anzahl der Aminosäurereste des Fragment-Ions an. Im Gegensatz zum PSD führt die Fragmentierung mittels Hochenergie-CID auch zu Seitenkettenbrüchen. Sie ermöglichen die Unterscheidung zwischen Leucin und Isoleucin (Johnson et al., 1987). Außerdem wird durch den Einsatz von CID der Anteil an gebildeten Immoniumionen erhöht und posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen an Serin und Threonin können durch den Verlust des Phosphats detektiert werden.

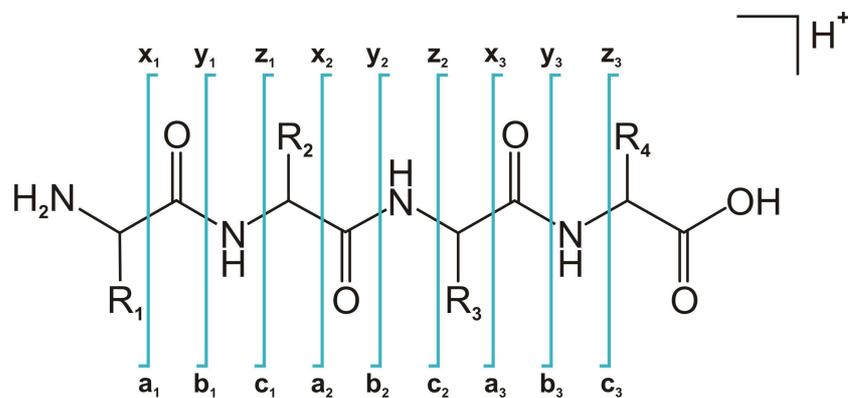


Abbildung 2-17: Fragmentierungs-Schema von Peptiden (Nomenklatur von Roepstorff, 1984)

2.5.8 ESI – *Elektrospray Ionisation*

Da ich während meiner Doktorarbeit nicht mit dieser Methode gearbeitet habe, möchte ich sie hier nur kurz erklären und auch nicht detailliert auf die einzelnen bei dieser Methode eingesetzten Massenanalytoren eingehen.

Der Begriff „*Elektrospray*“ beschreibt die Dispersion einer Flüssigkeit in sehr viele kleine geladene Tröpfchen mit Hilfe eines elektrostatischen Feldes. Malcolm Dole und seine Mitarbeiter waren die Ersten, die die Erzeugung von Makromolekül-Ionen aus Polyesterol mittels Elektrospray zeigten, allerdings ohne eine massenspektrometrische Trennung und den Nachweis der Ionen. (Dole et al., 1968). Erst Mitte der achtziger Jahre gelang der Durchbruch dieser Technik, nachdem die Arbeitsgruppe um J. Fenn ein Quadrupol-Massenspektrometer zur Analyse der Ionen einsetzte, und statt der anfänglich untersuchten heterogenen technischen Polymere, homogene biologische Makromoleküle (Proteine) analysierte. Damit war die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie etabliert (Fenn et al., 1988; Fenn et al., 1989).

Die ESI-Methode gehört, neben der MALDI-Technik, zu den „schonenden“ Ionisierungsmethoden. Das Prinzip der ESI-Methode beruht auf der Tatsache, dass sich eine Analytlösung unter Atmosphärendruck in einem elektrischen Feld zu einem Nebel feinsten hoch geladener Tröpfchen versprühen lässt. Die Analytlösung wird dabei aus einer leitfähigen Kapillare versprüht. Zwischen der Kapillare und dem Einlass in das Vakuum des Massenspektrometers liegt ein elektrisches Feld von einigen Kilovolt. Je nach Ausrichtung des elektrischen Feldes werden positive oder negative Ionen an die Flüssigkeitsoberfläche gezogen.

Bei der ESI-Methode kommt es zur Bildung mehrfach geladener Ionen der allgemeinen Formel $[M+nH^+]^{n+}$, wobei M für die Masse des Analyten steht und n die Anzahl der Ladungen angibt. Moleküle < 1000 Dalton sind meistens einfach geladen, während bei größeren Analytmolekülen bevorzugt mehrfach geladene Ionen gebildet werden. Ungefähr eine zusätzliche Ladung pro 1000 Dalton kommt hinzu.

Ein Nachteil der ESI- gegenüber der MALDI-Methode ist die kontinuierliche Ionenerzeugung. Da kein Massenanalysator in der Lage ist, kontinuierlich alle Ionen zu analysieren, sondern nur in bestimmten Abständen misst, wird immer ein Teil der Probe nicht untersucht und damit quasi „verschwendet“. Außerdem ist ESI deutlich weniger robust als MALDI. Die Proben müssen weitestgehend frei von Puffern und Detergenzien sein. Sie können einen kontinuierlichen Sprühfluss verhindern und führen zur Ionensuppression im Spektrum. Ein großer Vorteil der ESI-Methode ist allerdings, die Möglichkeit der einfachen direkten Kopplung mit flüssigchromatographischen Trennsystemen wie HPLC oder nanoLC.

2.5.8.1 *Angewandte Massenanalytoren bei ESI*

Als Massenanalytoren werden bei der ESI-Technik hauptsächlich Quadrupole und Ionenfallen eingesetzt. Es handelt sich dabei um scannende Massenanalytoren, die für MALDI ungeeignet sind, weil sie nur über einen kleinen m/z -Bereich zwischen 50 und 4000 messen können. Da bei ESI ab einer bestimmten Größe mehrfach geladenen Ionen gebildet werden, können in diesem Fall auch große Moleküle noch erfasst werden. Das Quadrupolmassenspektrometer ist eigentlich ein Massenfilter. Unter einer vorgegebenen physikalischen Bedingung werden nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis zum Detektor durchgelassen. Häufig kommen mehrere hintereinander geschaltete Quadrupole zum Einsatz (Triple-Quadrupol). Im ersten Quadrupol (Q_1) wird der gewünschte Analyt selektiert, im zweiten Quadrupol (Q_2) wird er fragmentiert (zum Beispiel mittels CID) und im dritten Quadrupol erfolgt die Massenbestimmung der Fragmente.

Das Prinzip der Ionenfalle ist das Einfangen von Ionen in einem geeigneten elektrischen Feld. Die Ionen werden dabei für eine variable Zeit (Mikrosekunden bis Sekunden) auf einer stabilen Bahn gehalten, um dann nach ihrer Masse analysiert zu werden. Aus den gefangenen Ionen kann aber auch ein gewünschtes Ion isoliert und anschließend fragmentiert werden. Theoretisch sind auch MS^n -Experimente möglich, allerdings nur bei genügend hoher Probenmenge.

Weitere Massenanalytoren, die bei der ESI-Technik Anwendung finden, sind das FT-ICR (Comisarow et al., 1974; Henry et al., 1989) und die Orbitrap (Makarov, 2000). Mit ihnen ist momentan die größte Auflösung und Massengenauigkeit zu erreichen (1 – 2 ppm). Die Orbitrap kommt mittlerweile auch bei der MALDI-Methode zum Einsatz.

Grundsätzlich ist es möglich, die einzelnen verschiedenen Analytoren miteinander zu kombinieren. Dies wird als Hybridmassenspektrometer bezeichnet. Ein Beispiel stellt das Quadrupol-o-TOF dar (Qq-oTOF). Hier wird zu zwei Quadrupolen orthogonal noch ein Flugzeitmassenanalysator nachgeschaltet. Damit kann im ersten Quadrupol der gewünschte Analyt isoliert und im zweiten Quadrupol fragmentiert werden. Die Auftrennung der gebildeten Fragmente erfolgt anschließend im orthogonalen Flugrohr aufgrund ihrer unterschiedlichen kinetischen Energien.

2.6 Proteomics

Nach den Fortschritten auf dem Gebiet der Genomik und der erfolgreichen Sequenzierung des humanen Genoms (Consortium, 2004; Lander et al., 2001; Venter et al., 2001) ist die Wissenschaft nun bestrebt, mit Hilfe dieses Wissens, Proteome unterschiedlicher Organismen zu analysieren. Der Begriff Proteom bezeichnet das quantitativ ermittelte Proteinmuster in einem Lebewesen, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment unter exakt definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt (Wilkins, 1996; Lottspeich 1999). Diese Definition macht deutlich, dass es sich hier nicht um ein statisches System wie das Genom handelt, welches in jeder Zelle und in jedem Entwicklungszustand des Organismus unverändert vorliegt. Das Proteom ist vielmehr ein hochdynamisches, sich ständig veränderndes Netzwerk. Einerseits ist die Proteinbiosynthese zell- und gewebespezifisch, andererseits haben die äußeren Bedingungen einen Einfluss auf die Qualität und Quantität der translatierten Proteine. Auch der dynamische Bereich an vorhandenen Proteinen einer biologischen Probe umfasst mehrere Zehnerpotenzen (Anderson & Anderson, 2002; Righetti et al., 2005). Die Erforschung eines Proteoms, auch Proteomics genannt, ist demnach eine sehr anspruchsvolle und schwierige Aufgabe, besonders wenn es um die Aufklärung von Proteomen höherer Eukaryonten geht. Großes Interesse gilt dabei natürlich der Aufklärung des menschlichen Proteoms. Aus der Aufklärung des menschlichen Proteoms versprechen sich Wissenschaftler neue Therapieansätze zur Heilung von Krankheiten, aber auch neue diagnostische Möglichkeiten, um eine Krankheit früh und sicher zu erkennen oder zu verhindern. Die Bedeutung von Proteinen als Target für die Arzneimittelentwicklung spiegelt sich in der Tatsache wider, dass 80% der Arzneimittel ihre Wirkung über Proteine vermitteln (Drews, 2000).

Die Erwartungen auf diesem Gebiet sind sehr hoch, vor allem seit das menschliche Genom sequenziert ist, und damit die Basis für die Aufklärung des menschlichen Proteoms geschaffen wurde. Doch nach der anfänglichen Euphorie Mitte der neunziger Jahre trat bald eine gewisse Ernüchterung ein. Es wurde klar, dass mit den heute zur Verfügung stehenden Methoden wie Gelelektrophorese, Chromatographie und Massenspektroskopie, eine Kartierung des kompletten Proteoms einer Zelle nicht so einfach möglich ist. Keine Methode schafft es den dynamischen Bereich einer biologischen Probe komplett abzudecken. Die sehr niedrig konzentrierten Proteine werden nicht erfasst.

Ein Lösungsansatz für die Reduzierung von komplexen Proben ist die Analyse von Subproteomen. Es werden beispielsweise nur bestimmte Proteinklassen, Organellen einer Zelle, Proteine mit bestimmten Modifikationen oder spezielle Proteinkomplexe betrachtet. Solche weniger komplexen Proben können bereits mit klassischen biochemischen Methoden, wie

Filtration und Zentrifugation, gewonnen werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Affinitätschromatographie mit der beispielsweise das Phosphoproteom einer Zelle über Metallionen (*metal-ion affinity chromatography*, IMAC) separiert und anschließend analysiert werden kann (Corthals et al., 2005; Nühse et al., 2007). Die Affinitätschromatographie kann aber auch genutzt werden, um hoch konzentrierte Proteine aus einem Proteingemisch zu reduzieren, und kann damit die Nachweisgrenze anderer Proteine erhöhen. Ein Beispiel dafür ist die Reduzierung von humanem Serumalbumin aus humanem Plasma (Urbas et al., 2008). Jedoch kann es hier aufgrund von Proteininteraktionen auch zu Verlusten von weniger abundanten Proteinen kommen.

Dies sind nur einige wenige Beispiele aus dem großen Analytikbereich von Proteomics. Es ist offensichtlich, dass nicht nur eine Methode alleine zum Ziel führen kann, sondern grundsätzlich verschiedene Ansätze in Betracht gezogen werden müssen, um ein Gesamtbild über ein bestimmtes Proteom zu erhalten. Je selektiver und damit auch kleiner ein Proteom gewählt wird, desto größer sind auch die Chancen es vollständig zu charakterisieren.

2.6.1 Protein-Protein-Interaktion: Proteinkomplexe

Funktionelle Multiproteinkomplexe stellen im Sinne von *Proteomics* das kleinste isolierbare Proteom dar. Die Untersuchung von Proteinkomplexen gibt uns die Möglichkeit, Funktionen innerhalb der Zelle oder des Zellkompartiments genauer zu verstehen. Erst durch das Verständnis der einzelnen kleinen Zusammenspiele innerhalb einer Zelle, können wir zum Beispiel die Auswirkungen auf ein betreffendes Organ und damit auf den Körper betrachten. Wir erhalten dadurch auch Informationen über die Funktion von spezifischen Genen und können so Erklärungsansätze für Gendefekte finden und über mögliche Therapieansätze nachdenken. Wenn wir die große Bedeutung des menschlichen Genoms verstehen wollen, ist es unabdingbar, dass die Funktions- und Struktureigenschaften von Proteinen und ihren Komplexen näher untersucht und aufgeklärt werden.

Viele Interaktionen von Proteinen sind leider nicht von Dauer, so dass es schwierig ist diese aufzuklären. Gerade Prozesse des Zellzyklus oder die Aktivierung der Transkription von Genen laufen sehr schnell und streng reguliert ab. Trotzdem gibt es mittlerweile eine ganze Reihe an Methoden um Proteininteraktionen und damit auch Proteinkomplexe zu charakterisieren.

2.6.1.1 Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse (Yeast Two Hybrid System)

Die bekannteste Methode ist die Hefe-Zwei-Hybrid-Analyse (*Yeast two hybrid system*). Hier greift man auf den Modellorganismus der Hefe zurück, da dessen Genom schon seit längerem vollständig entschlüsselt ist und auch die Proteinwechselwirkungen analysiert sind. Das zu untersuchende Protein wird dabei an die Bindedomäne eines Transkriptionsfaktors gekoppelt, während der mögliche Interaktionspartner an die Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors gebunden wird. Beide Proteine werden anschließend in der Hefe exprimiert. Nur bei einer Interaktion der beiden Proteine kommt es zur Aktivierung eines so genannten Reportergens, dessen Ergebnis die Bildung eines Farbstoffs ist. Diese Methode klärt allerdings nur die Frage, ob Protein A mit Protein B interagiert. Es liefert keine Darstellung der aktuellen Situation in einem bestimmten Zelltyp, und es können auch nur binäre Interaktionen ermittelt werden. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist die Anzahl an falsch positiven Ergebnissen, wenn die Bedingungen nicht sehr streng gewählt werden. So wurde eine Hochdurchsatz Untersuchung der Hefe von zwei Arbeitsgruppen durchgeführt, und die gefundenen Interaktionen aus beiden Arbeitsgruppen überlappten nur in 15% (Ito et al., 2001; Uetz et al., 2000).

2.6.1.2 Isolierung von Proteinkomplexen

Ausgehend von der im Kapitel 2.6 beschriebenen Komplexität des Zell-Proteoms wird ersichtlich, dass man mindestens einen hoch spezifischen Reinigungsschritt braucht, um Moleküle anzureichern, die nur in geringer Kopienzahl in der Zelle vorkommen. Diese Anreicherung und Reinigung von Proteinkomplexen kann mit Hilfe einer Reihe von biochemischen Methoden erreicht werden. Eine Möglichkeit der Komplexanreicherung ist die Größenausschlusschromatographie. Sie trennt die verschiedenen Komplexe einer Zelle oder eines Kompartiments aufgrund deren Größe. Diese Methode ist allerdings nicht sehr genau, und es wird sich nie nur ein Komplex in einer Fraktion befinden. Sie gibt allerdings Aufschluss über die ungefähre Größe des Komplexes und damit über die Menge an Interaktionspartnern. Breite Anwendung zur Komplexisolierung finden affinitätschromatographische Methoden. Sie sind in den meisten Fällen hochselektiv und erlauben eine robuste Reinigung. Außerdem sind diese Methoden gut reproduzierbar und einfach in der Anwendung.

Einige Affinitätsreinigungen sind in Tabelle 2-3 exemplarisch vorgestellt:

Methode	Vorteile	Nachteile	Anwendung
Immunopräzipitation	<ul style="list-style-type: none"> Keine Klonierung schnelle Methode bei gutem Antikörper 	<ul style="list-style-type: none"> Kreuzreaktivität Elution des Antikörpers von der Säule nicht generell anwendbar (abhängig vom Antikörper) 	<ul style="list-style-type: none"> Präparative IP Co-IP aus Zellkultur oder Geweben
Epitope	<ul style="list-style-type: none"> Allgemeine Anwendung möglich Geringe Mengen an Protein/ Komplexen können gereinigt werden sehr kleine Marker native Komplexreinigung möglich 	<ul style="list-style-type: none"> ektopische Genexpression nötig Marker kann Proteinfunktion beeinflussen 	<ul style="list-style-type: none"> proteomweit anwendbar
GST-Pulldown	<ul style="list-style-type: none"> Allgemeine Anwendung möglich Geringe Mengen an Protein/ Komplexen können gereinigt werden Auch bei schwachen Interaktionen anwendbar 	<ul style="list-style-type: none"> Komplexbildung in vitro steht in Konkurrenz zum bereits in vivo gebildeten Komplex 	<ul style="list-style-type: none"> Protein-Interaktionsstudien Komplexreinigung aus Gewebe
Tandem-Affinitäts-Reinigung	<ul style="list-style-type: none"> Allgemeine Anwendung möglich Geringe Mengen an Protein/ Komplexen können gereinigt werden 	<ul style="list-style-type: none"> ektopische Genexpression nötig Marker kann Proteinfunktion beeinflussen relativ großer Marker 	<ul style="list-style-type: none"> Komplexreinigung aus Gewebe proteomweit anwendbar

Tabelle 2-3: Stärken und Schwächen der allgemein eingesetzten Proteinaffinitätsreinigungen
(abgewandelte Tabelle aus Bauer & Kuster, 2003)

In dieser Arbeit wurden Komplexe über die Epitope Flag und Strep angereichert (Brizzard et al., 1994; Junttila et al., 2005). Diese Tags haben den Vorteil, dass sie sehr klein sind und somit die Funktion des Proteins nicht oder nur ganz schwach beeinflussen. Außerdem ist es mit dem Strep-Tag möglich, in nur einem einzigen Reinigungsschritt, den Komplex zu isolieren. In Abbildung 2-18 ist der Arbeitsablauf einer Strep-Reinigung dargestellt. Diese Methode ist sehr einfach und schnell durchzuführen. Der Verlust von schwachen Interaktionspartnern kann eventuell reduziert werden, im Vergleich zu mehrstufigen Reinigungsschritten, die eigentlich immer mit einem Verlust an Probe einhergehen. Die Anzahl an unspezifischen Bindungen ist relativ gering, verglichen zum Beispiel mit der Reinigung über Nickel-Beads.

Ein Nachteil aller affinitätschromatographischen Reinigungen ist allerdings die Tatsache, dass das genetisch veränderte Protein von einer Zelle exprimiert werden muss. Dies ist nicht immer auf Anrieb gewährleistet. Zudem steht das genetisch veränderte Protein ständig in Konkurrenz zum endogenen Protein.

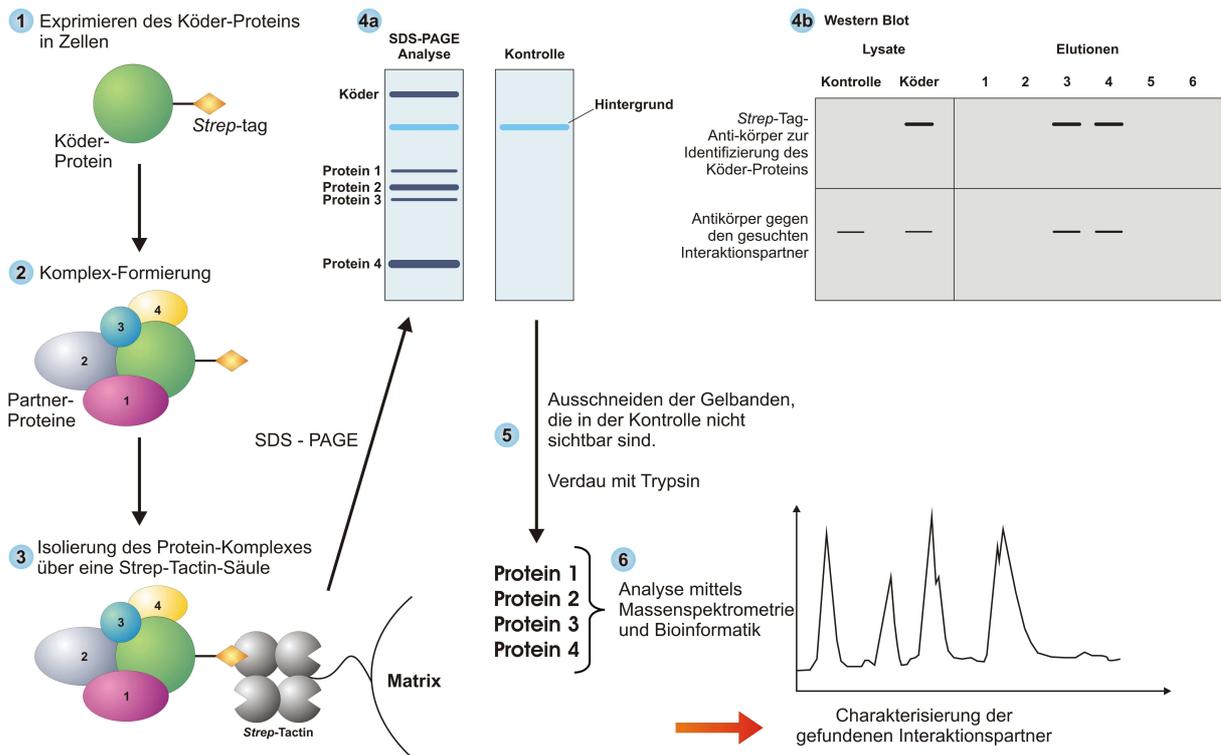


Abbildung 2-18: Schematische Darstellung der Strep-Tag-Reinigung mit anschließender Analyse der gefundenen Interaktionspartner mittels Western Blot bzw. Massenspektrometrie

2.6.2 Proteinidentifizierung mittels Western Blot

Western Blot, auch Immunoblot genannt, bezeichnet die Übertragung (engl. *blotting*) von Proteinen auf eine Trägermembran. Diese Technik wurde 1979 zum ersten Mal von Renart und Towbin unabhängig voneinander beschrieben (Renart et al., 1979; Towbin et al., 1979). Mittlerweile ist der Blot ein vielseitiges und beliebtes Werkzeug des Proteinbiochemikers, denn im Vergleich zum SDS-Gel, ist die Membran leicht zu handhaben. Das Protein liegt quasi „nackt“ auf der Membran. Es kann angefärbt werden, mit Antikörpern reagieren, chemisch oder proteolytisch gespalten werden (Aebersold et al., 1987; Scott et al., 1988; Eckerskorn et al., 1989) und beispielsweise massenspektrometrisch analysiert werden (Eckerskorn et al., 1992; Strupat et al., 1994). Entscheidend ist allerdings der erfolgreiche quantitative Transfer der Proteine. Dieser ist wiederum abhängig von der Wahl des Transferpuffers, der Art des Gels, den physikalischen Eigenschaften der Membran, den elektrischen Bedingungen beim Transfer und letztlich von den chemo-elektrischen Eigenschaften der zu bewegenden Proteine. Die Nitrozellulose- oder die PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid) wird häufig eingesetzt (Pluskal et al., 1986; Matsudaira, 1987). Erstere besitzt eine hohe Proteinbindungskapazität, ist jedoch chemisch unbeständig, was ihren Einsatz für Aminosäureanalysen oder Sequenzierungen unmöglich macht. Zudem ist diese

Membran in trockenem Zustand brüchig und leichtentzündlich. PVDF-Membranen sind hydrophober als Nitrozellulosemembranen und sowohl mechanisch als auch chemisch stabil. Sie eignen sich für Proteinfärbung, Immunofärbung, Lektinfärbung und für Aminosäure-Sequenzierungen und –analysen. Allerdings haben sie den Nachteil, dass sie, im Gegensatz zu Nitrozellulose, selbst kleine Mengen an Protein nicht vollständig binden. Je nach Protein passieren 10 bis 50% die Membran ungebunden.

2.6.2.1 Das Blotting

Zum Überführen der Proteine auf die Membran gibt es zwei verschiedene Systeme: das *Tank Blotting* und das *Semidry Blotting*. Beim *Tank Blotting* wird das Gel zusammen mit der Membran zwischen einen Stapel von Filterpapieren angeordnet und in eine Halterung eingespannt. Dieser Vorgang muss in der Pufferlösung erfolgen, um Blasenbildung zwischen den einzelnen Schichten zu vermeiden. Dieses „Paket“ wird danach vertikal in einer Pufferkammer mit Platindrähten als Elektroden fixiert und vollständig mit Pufferlösung bedeckt. Das Blotting geschieht unter konstanter Spannung, wobei der elektrische Widerstand der Lösung während des Transfers steigt und dadurch auch die Stromstärke. Es kommt zu einer starken Wärmeentwicklung, so dass beim *Tank Blotting* auf eine ausreichende Zirkulation und Kühlung des Puffers zu achten ist.

Das *Semidry Blotting* System besteht aus zwei Platten als Elektroden (zum Beispiel Graphit) zwischen denen ein Stapel aus Filterpapier, Gel und Membran horizontal geschichtet ist. Das Filterpapier wird dabei mit der Pufferlösung durchtränkt und in Schichten mit der Membran und dem Gel auf der Anode platziert. Um Luftblasen zwischen den Schichten zu verhindern, wird der Stapel mit einem Glasstab glatt gestrichen. Geblottet wird bei konstanter Stromstärke. Aufgrund der hohen elektrischen Leitfähigkeit der Elektroden und der relativ geringen elektrischen Energie muss bei dieser Methode nicht gekühlt werden. Die ablaufende elektrochemische Reaktion von Wasser führt zur Ausbildung eines pH-Gradienten (Kathode: pH ca. 12, Anode: pH ca. 2) und zu einer kontinuierlichen Gasentwicklung, die den Blot aufquellen lässt und den elektrischen Widerstand erhöht. Dies wiederum führt zu einer nicht reproduzierbaren Steigerung des elektrischen Felds. Um diesen Effekt zu minimieren, wird ein Gewicht von bis zu 2 kg auf die Blotapparatur gestellt.

Die Vorteile des *Semidry Blotting* Verfahrens gegenüber dem *Tank Blotting* sind die leichtere Handhabung, der deutlich reduzierte Pufferverbrauch, signifikant kürzere Blot-Zeiten und die geringere Hitzeentwicklung. Außerdem zeigten Tovey und Baldo 1987, dass der Proteintransfer beim *Semidry Blotting* effizienter abläuft, und dass sich diese Membranen etwas sensitiver anfärben lassen, da sich die Proteine unter diesen Bedingungen eher an der Oberfläche der Membran anzulagern scheinen (Tovey & Baldo, 1987).

Die Schwierigkeit beim Blotten liegt in der Übertragungseffizienz des Proteins vom Gel auf die Membran. Je größer das Protein desto schlechter lässt es sich auf die Membran übertragen und desto länger muss geblottet werden. Bei großen Proteinen (> 150 kDa) ist es demnach kaum möglich das Protein zu 100% quantitativ auf die Membran zu transferieren. Außerdem können durch längeres Blotten kleine Proteine verloren gehen, weil sie durch die Membran hindurch geblottet werden.

2.6.2.2 Die Immunfärbung

Vor der Reaktion eines Blots mit Antikörpern müssen die restlichen Proteinbindungsstellen der Membran abgesättigt werden. Als Blockmittel kommen zum Beispiel BSA, entfettetes Milchpulver oder Gelatine in Frage. Nach dem Blockieren wird die Membran mit einem Antikörper gegen das gesuchte Protein bzw. Antigen inkubiert. Ungebundener Antikörper wird anschließend abgewaschen und die Membran erneut mit einem 2. Antikörper inkubiert. Dieser zweite Antikörper ist gegen die schwere Kette des ersten Antikörpers gerichtet und trägt eine Markierung mit deren Hilfe die Position des Antigens sichtbar gemacht werden kann. Bei der Markierung handelt es sich meistens um das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP engl. *Horse-radish peroxidase*). Die Alternativen ^{125}I oder alkalische Phosphatase werden kaum noch angewendet, da sie oder ihre Reaktionsprodukte gesundheitsschädlich sind und eine geringere Sensitivität aufweisen. Peroxidase-gekoppelte Antikörper katalysieren die Oxidation von Luminol und lösen eine Chemilumineszenz aus. Das entstehende Licht wird über einen Film gemessen. Die Nachweisgrenze von Western Blots liegt dabei zwischen 10 und 100 fmol (Harlow & Lane, 1988).

Die Spezifität der Immunfärbung hängt von der Spezifität des ersten und des zweiten Antikörpers ab, und auch von der Verdünnung in der die Antikörper eingesetzt werden. Somit ist eine große Schwachstelle der Immunfärbung die Qualität der eingesetzten Antikörper. Sind sie nicht spezifisch genug, dann kann auch keine Aussage über das Vorhandensein eines gesuchten Proteins getroffen werden. Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist außerdem, dass nur gezielt gesuchte Proteine nachgewiesen werden können. Nur was erwartet wird, kann also gefunden werden.

2.6.3 Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie

Es gibt zwei verschiedene Methoden zur Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie. Die erste Methode ist der Peptidmassenfingerabdruck (engl. *peptide mass fingerprint*, PMF; Pappin et al., 1993; Henzel et al., 1993; Mann et al., 1993) und die zweite Methode ist die Proteinidentifizierung mittels MS/MS-Experimenten. In beiden Fällen werden die Proteine zuvor mit Hilfe von Proteasen in charakteristische Peptidfragmente gespalten. Für eine PMF-Analyse erfolgt die enzymatische Spaltung der Proteine nach erfolgreicher gelelektrophoretischer oder chromatographischer Auftrennung. Dazu werden die gewünschten Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und dann einem enzymatischen Gel-Verdau unterzogen und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

Die enzymatische Spaltung der gesamten Proteinlösung ist eine andere Möglichkeit. Das erhaltene Peptidgemisch wird anschließend typischerweise über eine nanoHPLC aufgetrennt und direkt mittels Massenspektrometrie analysiert. Hier ist allerdings nur die Identifizierung mittels MS/MS möglich und nicht mit PMF.

Als Protease wird in der Regel die Endopeptidase Trypsin eingesetzt, die mit hoher Spezifität C-terminal zu den Aminosäuren Arginin und Lysin schneidet (Olsen et al., 2004). Es gibt aber noch eine Reihe weiterer Enzyme, die in der Massenspektrometrie angewendet werden wie zum Beispiel Proteinase K (Wu et al., 2003a+b), Elastase (Schlosser et al., 2005), Pepsin (Han et al., 2004) oder Chymotrypsin bzw. die Kombination aus Trypsin und Chymotrypsin (Fischer et al., 2006).

2.6.3.1 PMF – *peptide mass fingerprint*

PMF basiert auf dem Vergleich von gemessenen Peptidmassen, in der Regel mit MALDI-TOF, mit berechneten Massen aus *in silico* Verdauexperimenten bekannter Protein- oder Gensequenzen unter zuvor definierten Bedingungen wie z.B. Spaltenzym oder Massentoleranz. Dazu werden sämtliche Proteine in einer Datenbank theoretisch verdaut, wobei dieselben Spaltregeln wie für das in dem Experiment benutzte Enzym verwendet werden. Eine Suchmaschine errechnet anschließend mit Hilfe eines Suchalgorithmus aus der Anzahl der Übereinstimmungen zwischen errechneten und gemessenen Massenlisten eine Wahrscheinlichkeit für die Signifikanz des identifizierten Proteins – einen sogenannten Score. Die Suchmaschine Mascot (Perkins et al., 1999), die den Suchalgorithmus MOWSE (engl. *molecular weight search*; Pappin et al., 1993) verwendet, wird häufig eingesetzt. In diesen MOWSE-Score fließen nicht nur die Größe, Anzahl und Massengenauigkeit der Peptide ein, sondern auch die Häufigkeitsverteilung bestimmter Peptidmassen innerhalb aller Proteine einer Spezies. Trotz guter Massengenauigkeit von nur

einigen ppm gibt es aufgrund der Größe der Datenbank und der damit verbundenen großen Menge an generierten Peptiden immer mehrere Proteine, denen eine bestimmte Peptidmasse zugeordnet werden kann. Für eine eindeutige Proteinidentifizierung mittels PMF sind immer mehrere Peptide notwendig.

Die Identifizierung mittels PMF wird erschwert, wenn zum Beispiel ein Protein nicht rein genug isoliert wird. Bei einem Proteingemisch werden zu viele unterschiedliche Peptide gebildet und deshalb eine eindeutige Zuordnung zu einem einzigen Protein verhindert. Außerdem schränken posttranslationale Modifikationen die Wahrscheinlichkeit einer Identifizierung noch zusätzlich ein, da durch Einbeziehung eventueller Modifikationen, die Wahrscheinlichkeit an Zufallstreffern noch erhöht wird.

2.6.3.2 MS/MS-Analyse

Wie bereits im obigen Abschnitt erwähnt, gibt es meistens mehrere Proteine, denen eine bestimmte Peptidmasse zugeordnet werden kann. Sind nun nicht genug Peptidmassen für ein signifikantes Ergebnis eines Proteins im Spektrum, so kann eine bestimmte Peptidmasse aus dem Spektrum ausgewählt und fragmentiert werden. Die Bestimmung der Aminosäuresequenz dieses Peptids ermöglicht den eindeutigen Nachweis eines Proteins. Jetzt ist es auch nicht mehr entscheidend wie viele Peptide diesem Protein zugeordnet werden können. Ein einziges gutes MS/MS-Spektrum kann für die Identifizierung ausreichen. Sehr wichtig bei diesen Messungen ist allerdings eine hohe Massengenauigkeit des ausgesuchten fragmentierten Peptids (*Precursor*). Je genauer die Masse, desto weniger theoretisch generierte Peptide passen auf diese Peptidmasse und desto weniger theoretische Fragmentspektren müssen von der Suchmaschine mit dem realen Spektrum verglichen werden.

Die Möglichkeit, mit nur ein bis zwei guten MS/MS-Spektren, ein Protein zu identifizieren wird bei der direkten Kopplung von HPLC mit Massenspektrometern ausgenutzt. Diese Methode hat den Vorteil, dass sie fast vollständig automatisierbar durchführbar ist und kein Verlust der Probe durch Auftrennung und Verdau im Gel entsteht. Auch kleinste Mengen eines Proteins, das in einem Gel eventuell nicht als Bande sichtbar wäre, sollten damit theoretisch identifizierbar sein. Aber auch hier muss auf eine hohe Massengenauigkeit des *Precursor* geachtet werden. Die produzierte Datenmenge solcher Versuche kann enorm groß werden und damit auch die Anzahl an falsch positiven Ergebnissen. Ergebnisse durch nur ein einziges Peptid sollten deshalb sehr kritisch betrachtet werden. So kommt es vor, dass die Datenbanksuche ein Peptid als signifikant identifiziert, obwohl das Spektrum bei genauer Betrachtung von absolut schlechter Qualität ist und deshalb eine eindeutige Zuordnung der Fragmente nicht möglich ist.

3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die biochemische Reinigung und Charakterisierung des nativen AF4- und des AF4•MLL-Proteinkomplexes. Die jeweiligen Proteine sollten in humanen Zelllinien exprimiert werden und anschließend über einen Strep-Tag gereinigt werden. Ein Reinigungsprotokoll, das die Komplexe nativ reinigt, sollte hierfür etabliert und optimiert werden. Mit Hilfe massenspektrometrischer Methoden, wie nLC-MALDI-MS/MS oder dem tryptischen Verdau von Gelbanden und anschließender PMF-Analytik, sollten unbekannte Partnerproteine identifiziert werden. Diese sollten im Anschluss durch weitere biochemische Methoden wie z.B. Western Blot Experimente oder Immunopräzipitationsexperimente verifiziert werden. Des Weiteren sollte mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie die ungefähre Größe der beiden Komplexe bestimmt werden und durch *in vitro*-Experimente eine enzymatische Methyltransferase-Aktivität gezeigt werden.

Das *AF4*-Gen ist der häufigste Translokationspartner des *MLL*-Gens. Über die zellulären Funktionen des AF4-Proteins war zu Beginn der Doktorarbeit noch wenig bekannt, so dass die Aufklärung des AF4-Proteinkomplexes Aufschluss über dessen Funktion in der Zelle geben sollte.

Bei der t(4;11)-Translokation entstehen die zwei Fusionsgene *MLL•AF4 (der11)* und *AF4•MLL (der4)*. Während das daraus resultierende der11-Fusionsprotein von anderen Arbeitsgruppen bereits intensiv untersucht wurde, gab es noch sehr wenige Erkenntnisse zur Rolle des der4-Fusionsproteins. Die Charakterisierung des der4-Proteinkomplexes sollte zum Verständnis des pathomolekularen Mechanismus der t(4;11)-Leukämie beitragen. Der Vergleich zum gereinigten AF4-Komplex und zum bereits bekannten MLL-Komplex sollte zudem aufzeigen, welche molekularen Veränderungen durch die Anwesenheit des der4-Fusionsproteins in der Zelle stattfinden könnten.

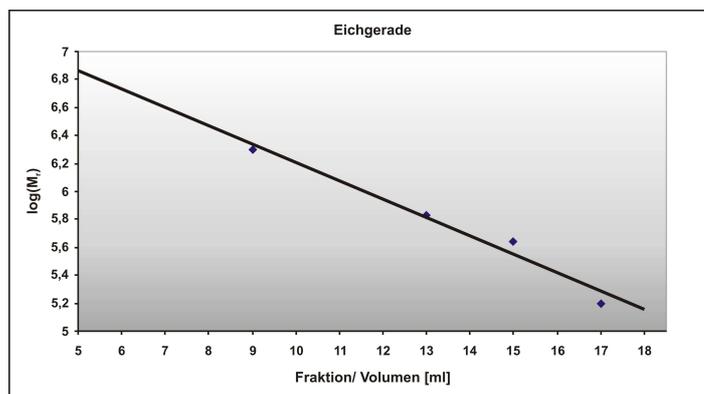
4 Ergebnisse

4.1 Größenausschlusschromatographie zur Abschätzung der Größe der Multiproteinkomplexe

Für eine ungefähre Abschätzung der Größe der Proteinkomplexe von AF4 und der4 wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Dafür wurden 293T-Zellen mit pTARGET-AF4 oder pTARGET-der4 transfiziert. Es wurden nicht markierte Proteine für diesen Versuch eingesetzt, damit eine Interaktion des Strep-Tags mit dem Säulenmaterial ausgeschlossen werden konnte. Die Zellen wurden 16 Stunden vor dem Schlachten/Lysieren mit MG 132 behandelt. 500 µl Zelllysat wurden auf die Säule geladen und 36 Fraktionen á 1 ml nach der Auftrennung erhalten. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Western Blot auf die Anwesenheit von der4 oder AF4 untersucht.

Die Proteine werden nach der Größe ihres Molekulargewichtes zwischen den Poren der Trennphase (Gel) und der mobilen Phase „filtriert“. Dies bedeutet, dass kleinere Proteine in die Poren eindringen können und diese durchwandern, während die großen Proteine an den Poren vorbeilaufen. Je kleiner demnach die Proteine sind, desto längere Verweilzeiten entstehen im Porensystem, so dass sie erst am Ende des Chromatogramms erscheinen. Große Proteine oder Komplexe erscheinen dagegen sehr früh im Chromatogramm.

Sowohl der AF4-Komplex als auch der der4-Komplex eluieren sehr früh von der Säule. Sie sind beide ab der Fraktion 8 im Western Blot nachweisbar, wobei für AF4 noch eine leichte Bande bis zur Fraktion 14 nachgewiesen werden kann, wohingegen der4 nur bis zur Fraktion 12 sichtbar ist. Bei genauer Betrachtung des Chromatogramms fällt auf, dass beide Komplexe im ersten großen Peak zu finden sind. Aufgrund der Trennung der Standardproteine kann eine Eichgerade erstellt werden und es ergibt sich für beide Komplexe ein ungefähres Molekulargewicht von 2-3 MDa. Da beide Proteine auch nicht zu einem späteren Zeitpunkt noch einmal eluieren, können wir annehmen, dass beide Proteine nur in einem Komplex vorliegen.



Fraktion	Größe (M _r)	Standardprotein
09	2 000 000	Blue Dextran 2000
13	669 000	Thyroglobulin
15	440 000	Ferritin
17	158 000	Aldolase

Abbildung 4-1: Bestimmung der Komplexgröße von AF4 und der4

links:

Eichgerade zur Bestimmung des Molekulargewichtes der Komplexe

rechts:

Tabelle mit den Standardproteinen, die zur Erstellung der Eichgerade verwendet wurden.

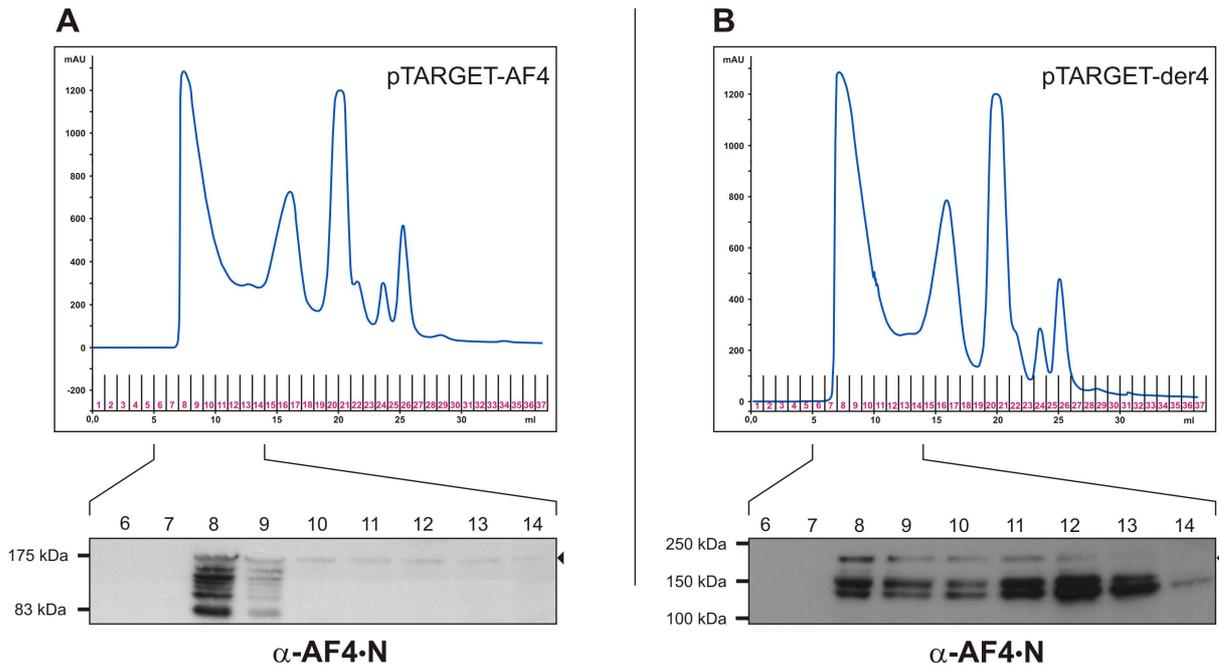


Abbildung 4-2: Resultate der Größenausschlusschromatographie von AF4 und der4

(A) oben: Größenausschlusschromatogramm von pTARGET-AF4; unten: Western Blot Ergebnis der getesteten AF4-Fractionen 6 bis 14, die Laufhöhe von AF4 ist mit einem Pfeil markiert

(B) oben: Größenausschlusschromatogramm von pTARGET-der4; unten: Western Blot Ergebnis der getesteten der4-Fractionen 6 bis 14, die Laufhöhe von der4 ist mit einem Pfeil markiert

4.2 Isolierung des AF4- und der4-Komplexes...

Die AF4-Proteinmenge in der Zelle unterliegt der Kontrolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist die Proteinmenge an AF4 in der Zelle daher sehr gering und im Western-Blot nicht detektierbar (Bursen et al., 2004). Der4 ist in gesunden Zellen überhaupt nicht vorhanden und kann deshalb nur durch einen eingebrachten Vektor in einer Zelle exprimiert werden.

Um die Zusammensetzung der Proteinkomplexe von AF4 und der4 bestimmen zu können, wurden die beiden Proteine in den Vektor pEXPR-IBA-103 kloniert und transient in 293T-Zellen transfiziert. Das AF4-Protein wurde bereits von Heidi Bursen in diesen Vektor kloniert. Aufgrund des Vektors erhielten die beiden Proteine einen C-terminalen Strep-Tag, der zur Reinigung der Proteinkomplexe genutzt wurde. Anschließend wurde in diesen Vektor noch ein N-terminales Flag-Tag kloniert. Dieser zusätzliche Flag-Tag sollte eine noch stringendere Reinigung der Komplexe ermöglichen.

4.2.1 ...mittels Strep-Tag

Für die Reinigung über den Strep-Tag wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Die Reinigung erfolgte entweder über eine bereits gepackte Strep-Tactin-Säule oder mittels einer Suspension aus Strep-Tactin-Beads (beides IBA GmbH). Letztere Methode diente der schnellen Reinigung kleinerer Mengen an Proteinkomplex.

Zunächst wurden ca. $5 \cdot 10^8$ 293T-Zellen für eine Säulenreinigung bzw. ca. $1,5 \cdot 10^8$ 293T-Zellen bei einer Reinigung mittels Strep-Tactin-Suspension nach der PEI-Methode (siehe Kapitel 6.3) transient mit dem jeweiligen Plasmid pEXPR-IBA-103-AF4/der4 transfiziert. Bei der Transfektion der Proteine AF4 und der4 wurden die Zellen noch zusätzlich 16 Stunden vor dem Ernten mit dem Proteasominhibitor MG 132 behandelt. Die Menge an transfiziertem Protein wurde dadurch erhöht. Die geernteten Zellen wurden eine Stunde in Lysispuffer inkubiert und die Zelltrümmer anschließend abzentrifugiert. Nach Inkubation des Lysats mit Avidin und erneuter Zentrifugation wurde das Lysat entweder über die zuvor equilibrierte Säule gegeben oder mit equilibrierten Beads inkubiert. Durch die Zugabe von Avidin wurde eine unspezifische Bindung anderer Proteine verhindert. Nachdem das Lysat zweimal vollständig durch die Säule gelaufen war bzw. die Beads mindestens eine Stunde mit dem Lysat inkubiert wurden, wurde mehrere Male mit Waschpuffer gewaschen bevor die Proteinkomplexe mit Biotinpuffer unterschiedlicher Stärke eluiert werden konnten (genaues Protokoll der zwei Reinigungen siehe Kapitel 6.4.1). Der Verlauf der jeweiligen Reinigung wurde entweder mit SDS-PAGE und anschließender Kolloidal-Coomassie-Färbung überprüft oder mit SDS-PAGE und Western Blot kontrolliert. Für den Nachweis der Proteine im Western Blot wurde der anti-AF4•N Antikörper eingesetzt. Dieser Antikörper wurde aus dem Zellüberstand einer Hybridomazelllinie gewonnen und anschließend gereinigt (siehe Kapitel 6.5.4). Die Kolloidal-Coomassie-Färbung zeigt, außer den charakteristischen AF4 (175 kDa) und der4 Banden (178 kDa und 320 kDa), noch viele weitere Banden im Gel, was eine erfolgreiche Reinigung an Komplexpartnern vermuten lässt. Um unspezifische Banden zu erkennen, wurden die jeweiligen Reinigungsprotokolle auch mit 293T-Zellen durchgeführt, die nur mit dem korrespondierenden Leervektor transfiziert wurden.

Auffallend bei den AF4-Reinigungen ist, dass das Protein nicht auf seiner theoretisch berechneten Molekulargewichtshöhe läuft. Es hat ein berechnetes Molekulargewicht von 132 kDa, läuft aber im Gel auf einer Höhe von ungefähr 175 kDa. Bei der4 sind zwei dominante Banden erkennbar: eine Bande bei 320 kDa – sie entspricht dem ungeschnittenen der4-Protein – und eine Bande bei 178 kDa – dies ist das N-terminale Fragment von der4 nach der Spaltung durch Taspase1.

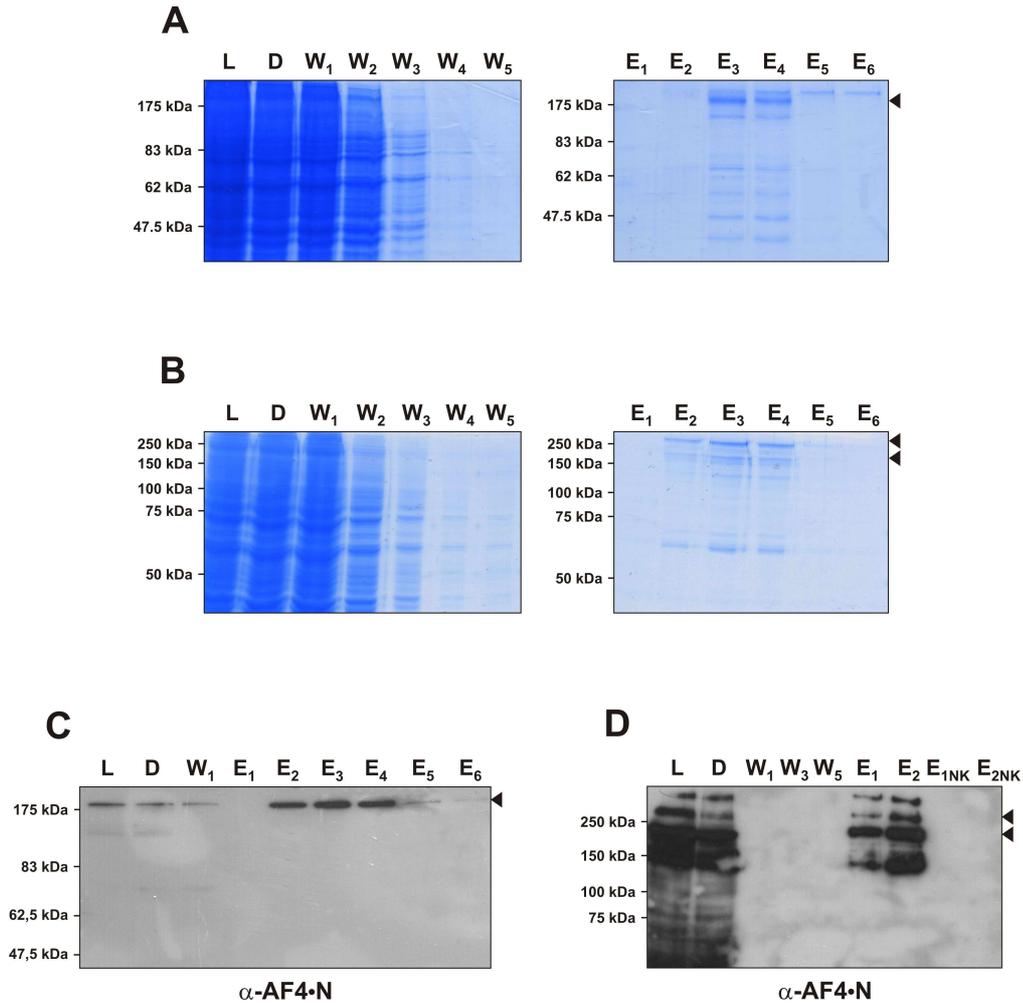


Abbildung 4-3: Strep-Tag Reinigungen von AF4 und der4

AF4-Reinigung **(A)** und der4-Reinigung **(B)** mittels einer Strep-Tactin Säule über ein 10%-iges SDS-Gels aufgetrennt. Kolloidale Coomassiefärbung.

(C) Western Blot einer Säulenreinigung von AF4,

(D) Western Blot einer Reinigung von der4 mittels der Strep-Tactin-Suspension.

L= Lysat, D= Durchlauf, W1-W5= einzelne Waschschrirte, E1-E6= Elutionen; E1NK und E2NK = Elutionen 1 und 2 der Negativkontrolle – über Strep-Tactin-Suspension gereinigt; Pfeile markieren die Proteinbanden von AF4 bzw. der4.

4.2.2 ...mittels Tandem Affinitätsreinigung über Strep- und Flag-Tag

Für die Tandemreinigung beider Proteine mit ihren Komplexpartnern wurde die gleiche Ausgangsmenge an Zellen eingesetzt, wobei diesmal mit dem Plasmid pEXPR-IBA-103-Flag-AF4/der4 transfiziert wurde. Der erste Reinigungsschritt erfolgte analog zur oben beschriebenen Strep-Reinigung, entweder über eine Strep-Tactin-Säule oder über die Strep-Tactin-Suspension. Die Elutionsfraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden anschließend vereint und mit bereits equilibrierten Flag-Beads für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurde mehrmals gewaschen und mit 2x Lämmli-Puffer eluiert. Die Elution mit einem Flag-Elutionspuffer blieb erfolglos. Dieser enthielt das Flagpeptid (Sigma), das den Komplex von den Beads verdrängen sollte. Diese Tatsache machte eine umgekehrte Tandem-Reinigung über Flag-Beads gefolgt von einer Strep-Reinigung unmöglich. Außerdem war mit dieser Elution ein in-Lösungsverdau, gefolgt von einer Trennung der generierten Peptide mittels nanoHPLC und anschließender MALDI-TOF/TOF Messung, nicht möglich.

Die Tandem-Reinigung der Proteine war zwar möglich, zeigte aber aufgrund des höheren Zeitaufwandes und der Tatsache, dass nur mit Lämmli-Puffer eluiert werden konnte, keine Vorteile gegenüber der alleinigen Reinigung über den Strep-Tag, so dass alle weiteren Experimente nur mit den Elutionen aus den Strep-Reinigungen durchgeführt wurden.

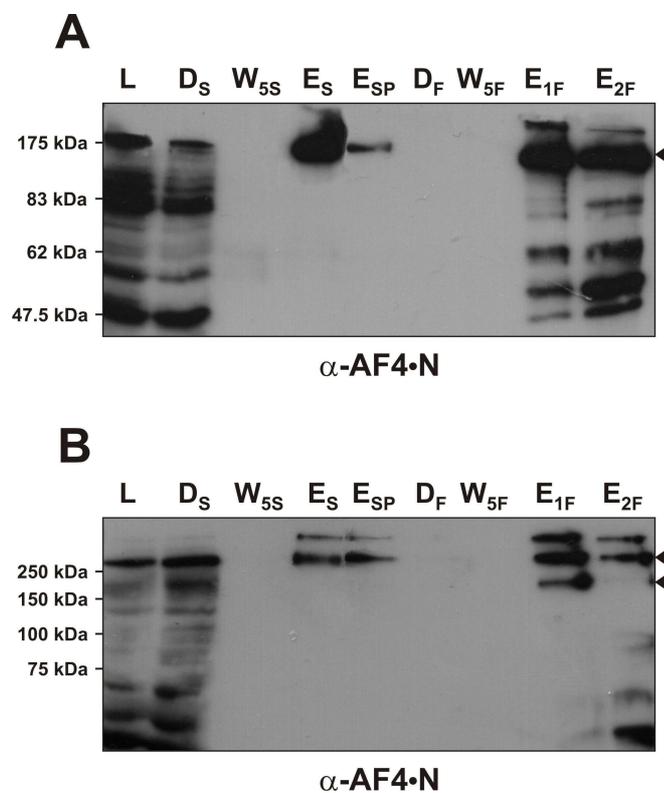


Abbildung 4-4: Tandem Affinitätsreinigung von AF4 und der4 über Strep- und Flag-Tag

(A) Western Blot einer AF4-Reinigung

(B) Western Blot einer der4-Reinigung

Die Strep-Reinigung beider Proteine erfolgte über eine Strep-Tactin-Säule. Anschließend wurde der Durchlauf nochmals mit der Strep-Tactin-Suspension inkubiert und erneut gereinigt, bevor die Elutionen aus beiden Reinigungsschritten (Säule und Beads) zusammen auf die Flag-Beads gegeben wurden. L= Lysat, D_S= Durchlauf der Reinigung über die Säule, W_{5S}= Waschschrift Nr.5 der Reinigung über die Säule, E_S= alle Elutionen der Säulenreinigung, E_{SP}= Elution der erneuten Reinigung des Durchlaufs von der Säule mit der Strep-Tactin-Suspension, D_F= Durchlauf der Flag-Reinigung, W_{5F}= Waschschrift Nr.5 der Flag-Reinigung, E_{1F} und E_{2F}= Elutionen 1 und 2 der Flag-Reinigung; Pfeile markieren die Proteinbanden von AF4 bzw. der4.

4.3 Identifizierung der Komplexpartner von AF4 und der4

4.3.1 Western Blot Ergebnisse

Für die Identifizierung von Komplexpartnern des AF4-Proteins, als auch die des der4-Proteins, wurden die Elutionen der Proteine zusammen mit der Elution der Negativkontrolle auf ein SDS-Gel geladen und anschließend geblottet. Handelte es sich bei den gesuchten Komplexpartnern um Proteine mit einem Molekulargewicht über 100 kDa, wurden die Elutionen auf ein 7,5%-iges SDS-Gel geladen und der Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte mit Hilfe von CHAPS-Puffer. Für Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 100 und 45 kDa wurde ein 10% iges SDS-Gel gewählt und noch kleinere Proteine wurden mit Hilfe eines 12% igen Gels aufgetrennt. In den beiden letzten Fällen wurde mit Anodenpuffer I, II und Kathodenpuffer geblottet. Die Blotdauer betrug je nach Molekulargewicht zwischen einer und 1½ Stunden.

Der AF4-Komplex

Zunächst wurden Antikörper gegen bereits bekannte Komplexpartner des AF4-Proteins eingesetzt. Damit konnte gezeigt werden, dass bei dieser Reinigung auch wirklich ein Proteinkomplex isoliert wird und nicht nur das transfizierte Protein. So war bereits bekannt, dass das ENL-Protein mit AF4 interagiert (Zeisig et al., 2005). Für die Proteine CDK9 und CCNT1 (Cyclin T1) konnte eine Interaktion mit AF4 in murinen Zellen gezeigt werden (Bitoun et al., 2007). Deshalb wurde eine Interaktion dieser Proteine in humanen Zellen auch angenommen. Nachdem diese Interaktionen in der AF4-Elution erfolgreich nachgewiesen werden konnten wurde überprüft, ob auch andere Proteine, die mit ENL assoziiert vorliegen am AF4-Komplex beteiligt sind. Es zeigte sich, dass die Proteine AF10 und DOT1L auch in diesem isolierten AF4-Proteinkomplex vorliegen. Diese Proteine wurden auch bereits im murinen AF4-Komplex identifiziert. Nicht nachgewiesen werden konnte allerdings eine Interaktion mit PC3 (Polycomb3), obwohl diese Interaktion über ENL bereits in der Literatur beschrieben wurde (Zeisig et al., 2005; Mueller et al., 2007). AF4 gilt als positiver Transkriptionsfaktor und stimuliert die transkriptionelle Elongation der RNA-Polymerase II (Bitoun et al., 2007). Deshalb wurde die AF4-Elution auch noch auf die Anwesenheit der RNA-Polymerase II getestet und auch diese konnte nachgewiesen werden.

Neben bereits bekannten Interaktionspartnern des AF4-Proteins sollten aber auch neue Proteine gefunden werden. Die Auswahl neuer potentieller Interaktionspartner erfolgte aufgrund von Literaturrecherchen. So wurde für die Proteine CDK9 und CCNT1, die zusammen das P-TEFb bilden, eine Interaktion mit BRD4, HEXIM1 und NFκB1 beschrieben. Ein Zusammenhang dieser Proteine mit AF4 war allerdings bis dahin noch nicht in der Literatur zu finden. Der

Western Blot auf NFκB1 und HEXIM1 zeigte positive Signale in der AF4-Elution, wobei HEXIM1 mit ca. 54 kDa höher läuft als sein berechnetes Molekulargewicht. Dies ist auch bereits im Datenblatt des Antikörpers angegeben. Eine Interaktion zwischen AF4 und BRD4 konnte leider nicht eindeutig bestätigt werden, denn von drei käuflich erworbenen Antikörpern gegen das BRD4-Protein zeigten zwei eine deutliche Kreuzreaktivität mit AF4, der dritte Antikörper reagierte nur sehr schwach auf der richtigen Höhe für BRD4 in der AF4-Elution. Hinzu kam auch noch, dass die Laufhöhen beider Proteine recht nahe beieinander liegen (152 kDa für das BRD4 und 175 kDa für das AF4). Deshalb konnte auch nicht überprüft werden, ob die zwei „unspezifischen“ BRD4-Antikörper nicht doch noch eine zusätzliche andere Bande detektieren, die bei einem Western Blot mit dem anti-AF4•N-Antikörper nicht auftaucht.

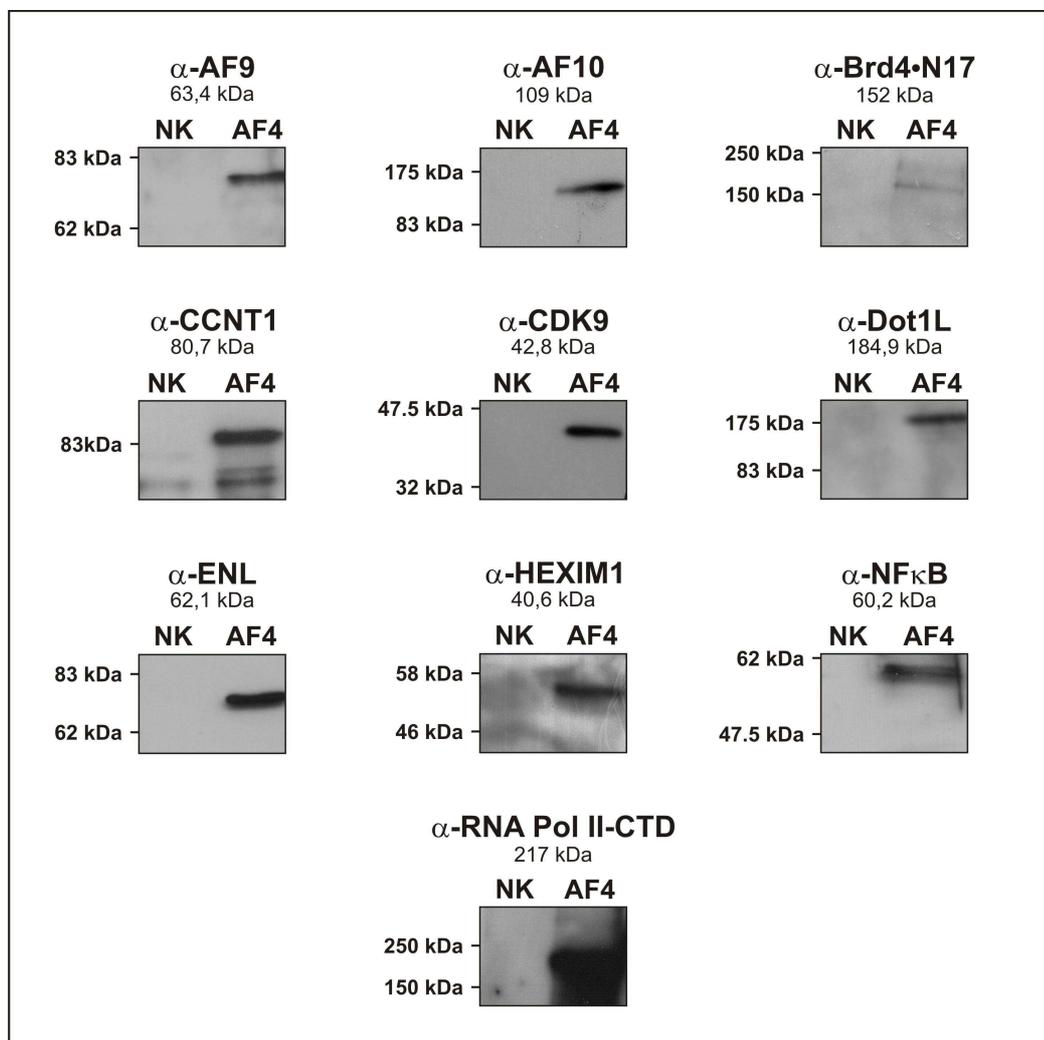


Abbildung 4-5: Mittels Western Blot identifizierte Komplexpартner von AF4

Verwendet wurden die positiv auf AF4 getesteten Elutionsfraktionen einer Strep-Tactin-Säulenreinigung. NK = Negativkontrolle: 293T-Zellen mit dem Leervektor transfiziert und über eine Strep-Tactin Säule gereinigt. Die gleichen Elutionsfraktionen wie für AF4 wurden eingesetzt.

Der der4-Komplex

Für das der4-Protein gibt es keine bereits bekannten Interaktionspartner. Da sich das der4 aber aus dem N-terminalen Bereich des AF4- und dem C-terminalen Bereich des MLL-Proteins zusammensetzt, kann davon ausgegangen werden, dass der der4-Komplex aus bekannten N-terminalen AF4-Interaktionspartnern und bekannten C-terminalen Interaktionspartnern des MLLs besteht. Eine positive Interaktion mit den Proteinen CDK9, CCNT1 konnte bestätigt werden und auch die MLL-Komplexproteine ASH2L, WDR5, RbBP5, HCF1 und HCF2 sind in der Elution des der4-Komplexes eindeutig nachweisbar. Diese Proteine interagieren mit der C-terminalen SET-Domäne des MLLs. Des Weiteren wurde das Protein CBP nachgewiesen, das im MLL-Wildtyp-Komplex mit der TAD-Domäne des MLL-Proteins interagiert. Es wurde daraufhin noch weiter untersucht, ob wirklich nur Proteine aus den jeweiligen N- oder C-terminalen Bereichen von AF4 und MLL interagieren. Der Proteinkomplex wurde deshalb auf die Anwesenheit von DOT1L (interagiert im C-terminalen Bereich von AF4) und MENIN (N-terminaler Interaktionspartner von MLL) untersucht. Beide Proteine konnten nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden noch zahlreiche weitere am MLL-Komplex beteiligte Proteine getestet, die aber alle keine Interaktion zum der4 aufwiesen (CYP33, E2F4, E2F6, GADD34, HIP2, MOF, N-CoR, RING2 und SMARCB1).

Für die neu entdeckten AF4-Interaktionspartner HEXIM1, BRD4 und NFκB1 konnten NFκB1 und HEXIM1 positiv für den der4-Komplex nachgewiesen werden. Der BRD4-Blot zeigte keine Bande, obwohl auch BRD4 über CCNT1 mit der4 hätte interagieren können.

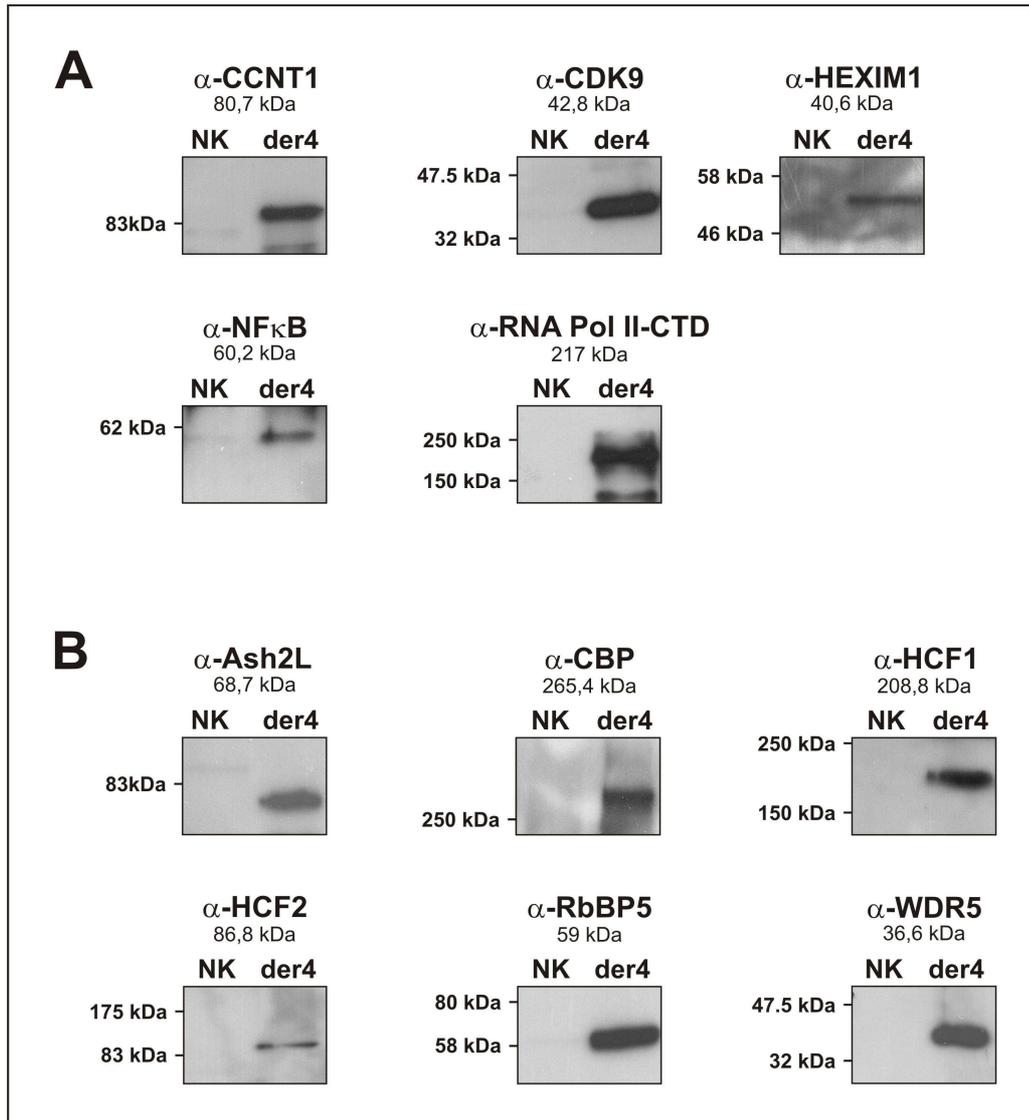


Abbildung 4-6: Mittels Western Blot identifizierte Proteine des der4-Komplexes

(A) Proteine, die an den AF4-Bereich von der4 binden.

(B) Proteine, die an den MLL-Bereich von der4 binden.

NK = Negativkontrolle: 293T-Zellen mit dem Leervektor transfiziert und über eine Strep-Tactin-Säule gereinigt. Die gleichen Elutionsfraktionen wie für der4 wurden eingesetzt.

Völlig unbekannte Interaktionspartner konnten per Western Blot für das der4-Protein nicht identifiziert werden. Auch die neuen Interaktionspartner des AF4 wurden nur aufgrund von Nachforschungen in der Literatur entdeckt. Deshalb wurden parallel die Elutionen von AF4 und der4 noch zusätzlich massenspektrometrisch untersucht. Mit dieser Methode sollte die Identifizierung bislang unbekannter Proteine möglich sein.

4.3.2 Tryptischer in-Gel Verdau der Elutionsbanden und anschließende MALDI-TOF Messung

Die Strep-Elutionen aus den Säulenreinigungen von AF4, der4 und der Negativkontrolle wurden über ein SDS-Gradientengel (7 – 15%) aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel fixiert und über Nacht mit kolloidaler Coomassielösung angefärbt. Alle Banden, auch die der Negativkontrolle, wurden ausgeschnitten und mit Hilfe eines Verdauroboters tryptisch verdaut. Die Proben wurden dabei während des Verdaus reduziert und alkyliert. Das genaue Verdauprotokoll ist in Kapitel 6.6.1 beschrieben. Anschließend wurden die verdauten und einrotierten Proben in 5 bis 10 μ l einer Lösung aus 50% ACN/ 0,1% FA rückgelöst. Als Matrix wurde α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure (α -CHCA) eingesetzt, die in einer Lösung aus 50% Acetonitril (v/v) / 0,1% (v/v) TFA gelöst wurde. 0,5 μ l Matrixlösung wurden auf einem Probenhalter aus Stahl vorgelegt und 0,5 μ l der Peptidlösung direkt dazu pipettiert. Die getrockneten Spots wurden danach noch gewaschen bevor der Stahlhalter in das Massenspektrometer eingeschleust werden konnte.

Die Proteine AF4 und der4 konnten dabei signifikant aus dem Gel identifiziert werden. Leider wurden mit dieser Methode weder die bereits mittels Western Blot identifizierten Interaktionspartner bestätigt, noch völlig neue und unbekannte Partnerproteine gefunden.

Es konnte aber für das AF4-Protein sehr deutlich gezeigt werden, dass es bei der Strep-Reinigung zu einer stark ausgeprägten Degradierung des Proteins kommt. Es können sogar noch AF4-Peptide auf einer Molekulargewichtshöhe von 32 kDa im Gel signifikant nachgewiesen werden. Diese gehören zum C-terminalen Teil des AF4-Proteins an dem sich auch der Strep-Tag befindet (Abbildung 4-7). Ähnliche Ergebnisse konnten auch für das der4-Protein gezeigt werden. Die Abbauprodukte des Proteins sind bis zu einer Masse von 150 kDa zu sehen, sind aber weniger stark ausgeprägt als bei AF4 (Abbildung 4-8). In beiden Fällen können die deutlich erkennbaren Gelbanden somit entweder dem AF4 bzw. der4 zugeordnet werden oder es handelt sich um unspezifische Proteine, die an das Strep-Tactin-Gerüst gebunden haben.

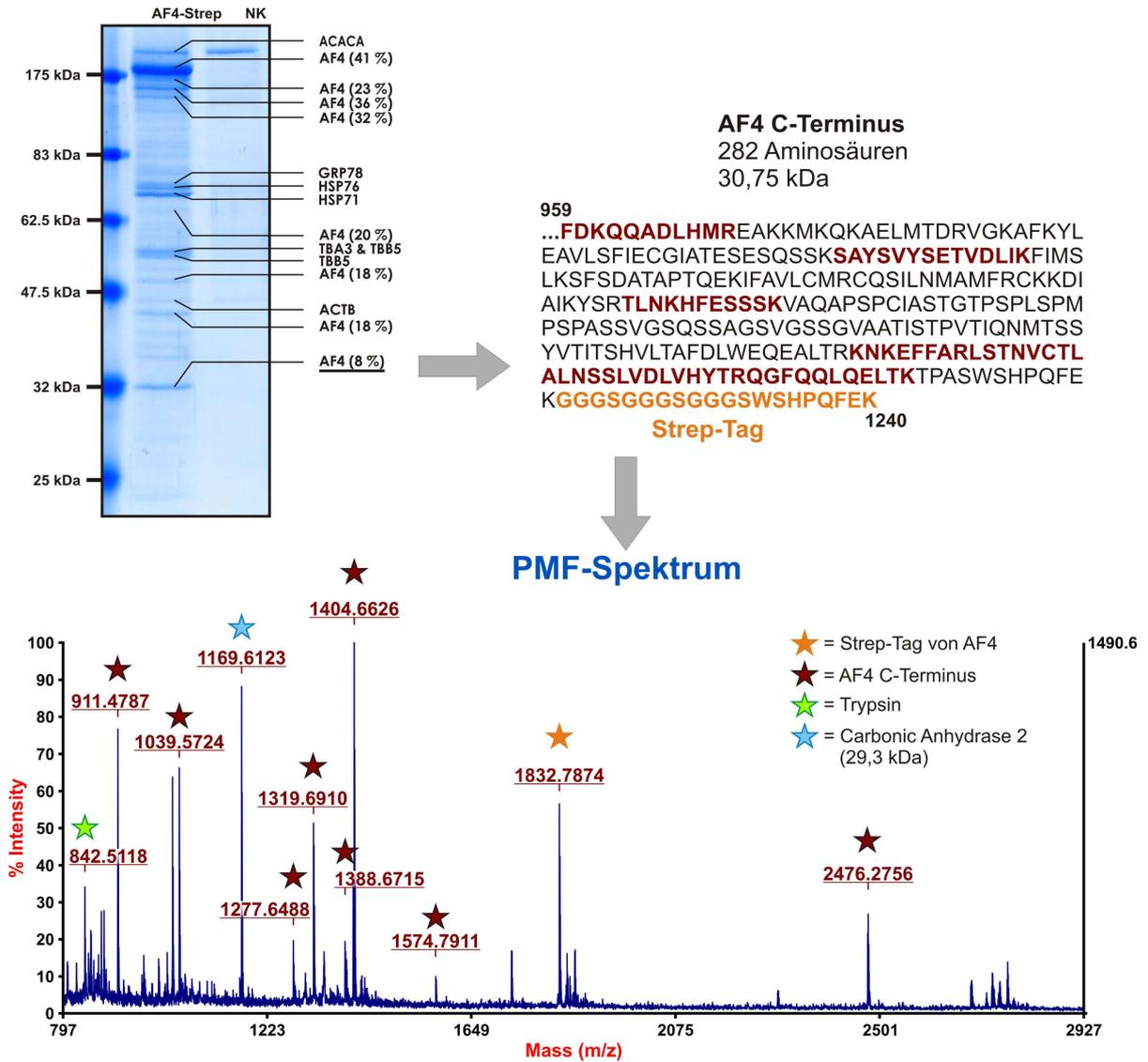


Abbildung 4-7: MALDI-Ergebnisse eines tryptischen In-Gel-Verdau einer AF4-Elution

Eingestellte Suchparameter waren: Datenbank: SwissProt oder AF4-MLL, Organismus: *Homo sapiens*, fixe Modifikation: Carbamidomethylierung der Cysteine, variable Modifikation: Methioninoxidation. Zudem wurde mit einer Massentoleranz von 50 ppm und zwei überlesenen Schnittstellen gesucht. Die Datenbank AF4-MLL beinhaltet alle potentiellen Interaktionspartner und alle bekannten unspezifisch bindenden Proteine. Mit ihrer Hilfe konnten die AF4 Abbruchbanden mit der dazugehörigen Sequenzabdeckung bestimmt werden. Dadurch konnte die deutlich sichtbare 32 kDa-Bande mit dem dazugehörigen Spektrum dem AF4 C-Terminus zugeordnet werden.

ACACA= Acetyl-CoA carboxylase 1, GRP78= 78 kDa glucose-regulated protein, HSP76= Heat shock 70 kDa protein 6, HSP71= Heat shock 70 kDa protein 1, TBA3= Tubulin alpha-1A chain, TBB5= Tubulin beta chain, ACTB= Actin, cytoplasmic 1

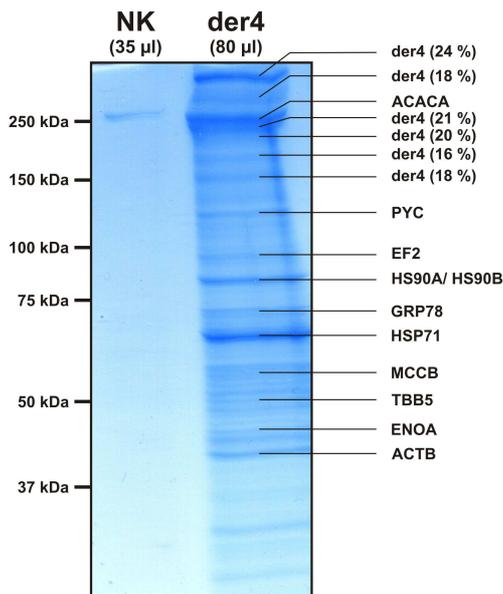


Abbildung 4-8: MALDI-Ergebnisse eines tryptischen in-Gel-Verdaus einer der4-Elution

Die Suchparameter waren die Gleichen wie in Abbildung 4-7, nur dass mit 80 ppm Massentoleranz gesucht wurde. Die MLL-AF4 Datenbank diente der Identifizierung von der4, da in der Datenbank SwissProt das komplette Protein nicht gelistet ist. ACACA= Acetyl-CoA carboxylase 1, PYC= Pyruvate carboxylase, mitochondrial, EF2= Elongation factor 2, HS90A/B= Heat shock protein HSP 90-alpha/ beta, GRP78= 78 kDa glucose-regulated protein, HSP71= Heat shock 70 kDa protein 1, MCCB= Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial, TBB5= Tubulin beta chain, ENOA= Alpha-enolase, ACTB= Actin, cytoplasmic 1

Die starke Überexpression von AF4 und auch der4 lässt annehmen, dass nicht jedes dieser Proteine im Komplex in der Zelle gebunden vorliegt, sondern dass auch einzelnes AF4- bzw. der4-Protein vorhanden ist und mit gereinigt wurde.

Um zu klären, ob dies nur an der zu geringen Menge an Interaktionspartnern in der Probe lag, wurden AF4 und ENL in 293T-Zellen co-transfiziert. Dabei wurden die Vektoren pEXPR-IBA-103-AF4 und pTARGET-ENL verwendet (pTARGET-ENL wurde bereits von A. Heil im Zuge ihrer Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Marschalek kloniert). Es folgte eine Säulenreinigung über den Strep-Tag des AF4-Proteins. Das vom Vektor exprimierte ENL sollte aufgrund seiner Interaktion zusammen mit dem AF4 gereinigt werden und die Gesamtmenge an bindendem ENL im Komplex erhöhen. Die Elutionen, die positiv im Western Blot auf AF4 und ENL getestet wurden, wurden vereint und zusammen mit einer Negativkontrolle, wie bereits bei AF4 und der4 alleine, über ein SDS-Gradientengel aufgetrennt. Nach der Färbung wurden nur die Banden auf der Höhe des zu erwartenden ENL-Proteins ausgeschnitten und einem tryptischen in-Gel Verdau unterzogen. Im Anschluss wurden die Proben wieder mittels Massenspektrometrie analysiert.

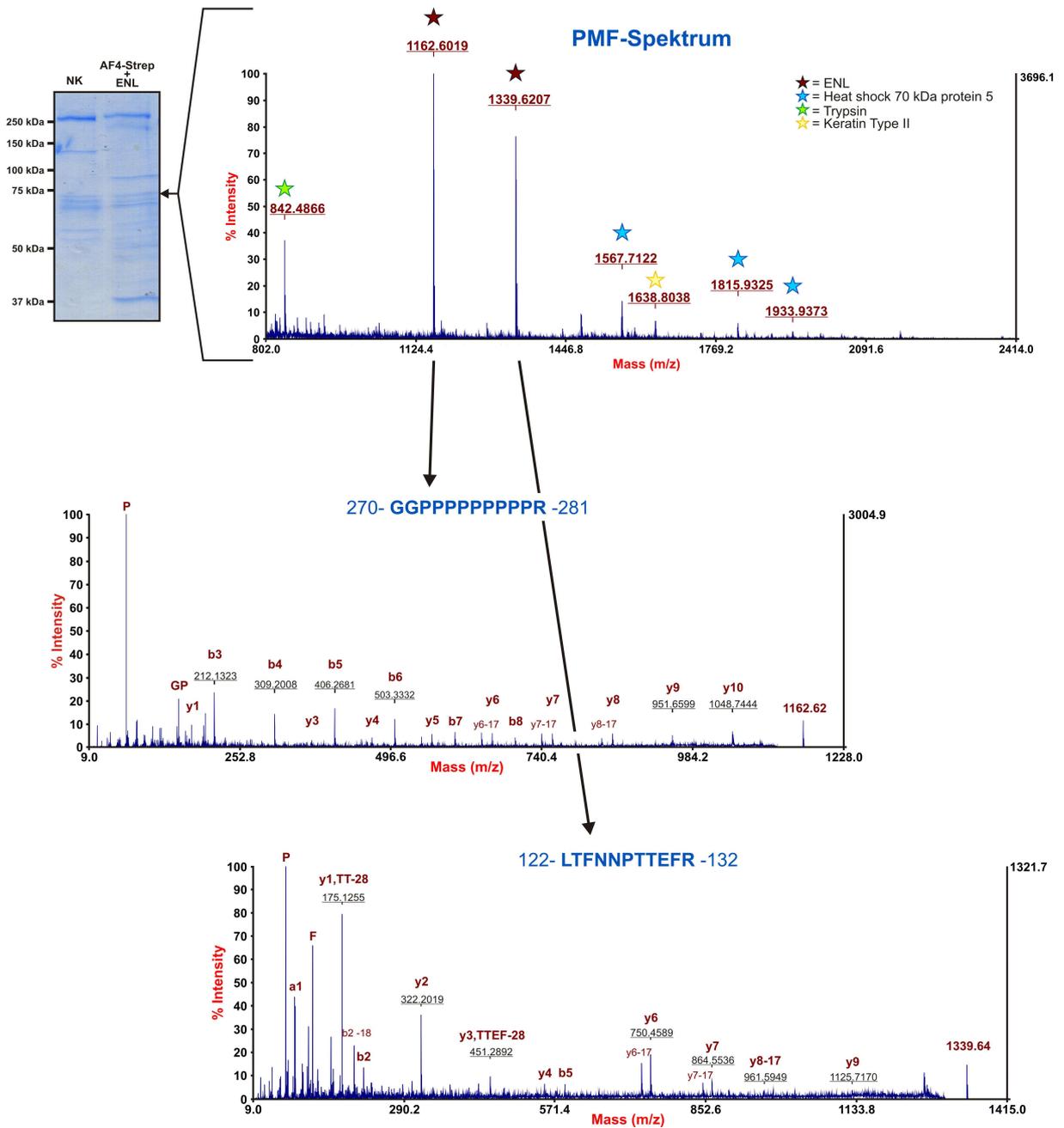


Abbildung 4-9: Identifizierung von ENL aus einem SDS-Gel der Co-Reinigung von AF4-Strep mit ENL
 Zu sehen ist das PMF-Spektrum der Bande auf Laufhöhe des ENLs und die MS/MS-Spektren der beiden höchsten Signale im PMF-Spektrum. Beide Signale stammen von Peptiden des ENL-Proteins.

Trotz der erhöhten Menge an ENL konnte kein signifikantes PMF-Spektrum für dieses Protein erhalten werden. Es konnte lediglich ein Spektrum aufgenommen werden, bei dem die beiden höchsten Signale durch MS/MS-Experimente dem ENL signifikant zugewiesen werden konnten. Dies zeigt, dass die geringe Menge an Komplexpartnern in der Probe nicht der alleinige Grund für die fehlende Identifizierung mittels Massenspektrometrie sein kann.

4.3.3 Ergebnisse aus den nLC-MALDI-MS/MS-Experimenten

In der Regel sind schon ein bis zwei gute MS/MS-Spektren für die signifikante Identifizierung eines Proteins ausreichend. Deshalb wurden in einem zweiten Ansatz die Strep-Elutionen von AF4, der4 und der Negativkontrolle in Lösung komplett verdaut. Das daraus entstandene komplexe Peptidgemisch wurde über nanoHPLC aufgetrennt und mit Hilfe eines Spotters direkt zusammen mit der Matrixlösung auf ein MALDI-Target aufgebracht. Die Messung der nLC-Läufe erfolgte anschließend am *4800 TOF/TOF Analyser*. Die dabei generierten Spektren wurden mit Hilfe der Suchmaschine MASCOT ausgewertet und eine Liste der identifizierten Proteine erstellt. Zu jedem Protein wurde die Anzahl der gefundenen Peptide angegeben. Jedes Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt.

Tabelle 4-1: Die identifizierten Proteine des AF4-Komplexes aus den nLC-MALDI-MS/MS-Experimenten

(Die komplette Liste der gefundenen Proteine befindet sich im Anhang, Tabelle 9-1). AC = *Accession number* des Proteins, MG = Molekulargewicht, pl = Isoelektrischer Punkt des Proteins

Treffer Nr.	AC	Protein	Peptide Σ	MG [kDa]	pl
1	P51825	AF4 (AFF1)	106	132,14	9,26
10	Q03111	ENL	22	62,42	8,75
24	P50750	CDK9	12	43,15	8,97
27	O60563	CCNT1 (CyclinT1)	11	81,03	8,9
33	P26196	DDX6	9	54,78	8,85
47	Q9UHB7	AF5q31 (AFF4)	7	127,78	9,33
50	P06748	NPM1 (Nucleophosmin)	6	32,73	4,64

Tabelle 4-2: Die identifizierten Proteine des der4-Komplexes aus den nLC-MALDI-MS/MS Experimenten

(Die komplette Liste der gefundenen Proteine befindet sich im Anhang, Tabelle 9-2). AC = *Accession number* des Proteins, MG = Molekulargewicht, pl = Isoelektrischer Punkt des Proteins

Treffer Nr.	AC	Protein	Peptide Σ	MG [kDa]	pl
1	Q03164	MLL (HRX)	131	436,04	9,22
2	P51825	AF4 (AFF1)	44	132,14	9,26
6	P51610	HCF1	14	210,7	7,49
17	Q15291	RbBP5	4	59,72	4,92

19	P61964	<i>WDR5</i>	4	37,14	8,54
20	P26196	<i>DDX6</i>	4	54,78	8,85
21	Q9UBL3	<i>Ash2L</i>	4	69,31	5,45
25	O60563	<i>CCNT1 (CyclinT1)</i>	3	81,03	8,9
32	P50750	<i>CDK9</i>	2	43,15	8,97
33	Q9C005	<i>DPY-30</i>	2	11,24	4,84
40	Q9Y5Z7	<i>HCF2</i>	2	87,69	8,75
64	P06748	<i>NPM1 (Nucleophosmin)</i>	1	32,73	4,64

Wie aus der Tabelle 4-1 zu erkennen ist, konnten für die AF4-Komplexreinigung einige Interaktionspartner aus den Western Blot Ergebnissen bestätigt werden. Dabei handelte es sich um die Proteine, die die stärksten Signale im Western Blot zeigten. Die im Western Blot neu identifizierten Komplexpartner BRD4, HEXIM1 und NFκB1 konnten mit diesem Experiment nicht bestätigt werden. Dafür wurde mit 9 Peptiden das Protein AF5q31 signifikant identifiziert. Dieses Protein gehört wie das AF4 zur ALF-Familie. Der nachträgliche Nachweis dieses Proteins im Western Blot scheiterte aufgrund der Kreuzreaktivität des gekauften Antikörpers mit dem AF4-Protein. Neben dem AF5q31-Protein konnten zwei weitere interessante Proteine identifiziert werden: Nucleophosmin (NPM1) mit 6 Peptiden und DDX6 mit 9 Peptiden. Diese Proteine waren auch nicht in der Negativkontrolle vorhanden.

Die Ergebnisse der der4 Komplexreinigung bestätigten fast vollständig die Resultate aus den Western Blot Ergebnissen. Lediglich die Existenz von NFκB1 und HEXIM1 im Komplex konnte – wie bei AF4 – nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich zu den bekannten Proteinen wurde noch das DYP-30-Protein identifiziert. Die Literatursuche ergab, dass dieses Protein mit den Proteinen ASH2L, WDR5 und RbBP5 assoziiert ist. Außerdem wurden auch hier die Proteine DDX6 (mit 4 Peptiden) und Nucleophosmin (mit einem Peptid) gefunden. Zusätzlich konnten neben N-terminalen Peptiden des AF4-Proteins auch noch 23 C-terminal Peptide identifiziert werden. Dies bedeutet, dass endogenes AF4 im der4-Komplex vorliegt.

Generell waren die Ergebnisse der einzelnen Reinigungen sehr unterschiedlich. Für die der4-Elution wurden insgesamt 82 Proteine identifiziert und die einzelnen MS/MS-Läufe waren fast identisch. Viele dieser Proteine stellen mitochondriale und cytosolische Verunreinigungen dar. Die Negativkontrolle ergab mit nur 20 gefundenen Proteinen die kleinste Liste (siehe Tabelle 9-3). Das nLC-Resultat der AF4-Elution war wesentlich komplexer und unreproduzierbarer. Die gesamte Liste an identifizierten Proteinen in der AF4-Elution umfasst 411 (!!!) Proteine, darunter 225 Proteine, die nur mit einem Peptid identifiziert wurden (so genannte „one hit wonder“). Auch die einzelnen Läufe waren sehr unterschiedlich, so dass für AF4 wesentlich mehr als nur drei

Experimente nötig waren, um die oben angegebenen Proteine zu identifizieren. Trotz allem befinden sich alle Komplexpartner von AF4 unter den ersten 50 Proteinen der Liste.

Die Proteine BRD4, HEXIM1, NFκB1, NPM1 und DDX6 wurden zunächst entweder nur mittels Western Blot oder nur durch nLC-MALDI-MS/MS Experimente identifiziert. Um diese Proteine auch wirklich als neue Komplexpartner in den jeweiligen Komplexen zu bestätigen, wurden Immunopräzipitationsexperimente zur Verifizierung durchgeführt.

4.3.4 Immunopräzipitation zur Verifizierung der neuen Komplexpartner

Für die Immunopräzipitationsexperimente wurden ca. $1,5 \cdot 10^8$ 293T-Zellen mit dem jeweiligen Plasmid (pEXPR-IBA-103, pEXPR-IBA-103-AF4 oder pEXPR-IBA-103-der4) transient transfiziert, mit MG 132 behandelt und nach dem Ernten in 0,6 ml Lysis-Puffer resuspendiert. Das von Zelltrümmern durch Zentrifugation befreite Lysat wurde anschließend für 30 Minuten mit Protein-G-Agarose-Beads inkubiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein leeres BioRad-Säulchen überführt und der Antikörper gegen den gesuchten Komplexpartner hinzugegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wurde erneut Protein-G-Agarose hinzugefügt, um den Antikörper mit seinen gekoppelten Proteinen an die Beads zu binden. Nach ausreichender Inkubation wurde das Lysat entfernt und die Beads konnten mehrfach gewaschen werden bevor die am Antikörper gebundenen Proteine mittels 2x-Lämmli-Puffer eluiert wurden (für das genaue Protokoll siehe Kapitel 6.4.3).

Der Nachweis von AF4 oder der4 in diesen Elutionen mittels Western Blot würde eine Interaktion mit den betreffenden Proteinen bestätigen.

Zunächst soll hier die Immunopräzipitation (IP) mit α-CCNT1 gezeigt werden. Dieses Protein wurde zwar bereits für beide Komplexe in zwei Experimenten nachgewiesen, zeigt aber, dass mit diesem IP-Protokoll eine erfolgreiche IP möglich ist.

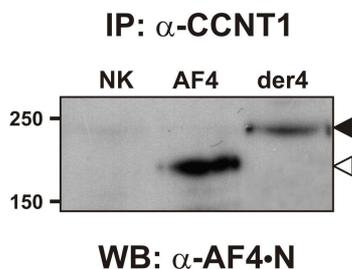


Abbildung 4-10: Nachweis von CCNT1 als Komplexpartner von AF4 und der4 mittels IP

NK = Negativkontrolle bzw. untransfizierte 293T-Zellen

Die Interaktion mit NPM1 sollte zunächst mittels Western Blot auf die Strep-Elutionen von AF4 und der4 untersucht werden. Der Western Blot zeigte auch eine deutliche Bande für AF4, aber für der4 war die Bande wesentlich schwächer. Für die endgültige Bestätigung der Interaktion wurde deshalb auch für NPM1 eine Immunopräzipitation durchgeführt. Jedoch konnte bei der IP auf endogenes NPM1 leider keine klare Aussage über eine Interaktion mit der4 getroffen werden. Deshalb wurde ein aus cDNA gewonnenes NPM1-Konstrukt gerichtet in den pTARGET-GFP-Vektor kloniert, so dass sich das GFP C-terminal am NPM1 befand. Nun konnte das NPM1-GFP-Konstrukt mit den Expressionskonstrukten von AF4 bzw. der4 gemeinsam in 293T-Zellen transfiziert werden, um somit eine unzureichende Interaktion aufgrund zu geringer Proteinmenge auszuschließen. Ein Vorteil dieses Versuchs war die Möglichkeit mit zwei Antikörpern (α -NPM und α -GFP) parallel eine IP durchführen zu können. Da bei diesem Experiment zwei Proteine zusammen transfiziert wurden, gefolgt von einer Immunopräzipitation, wird in diesem Fall auch der Ausdruck Co-Immunopräzipitation oder Co-IP verwendet. Bei der Co-IP von NPM1 mit AF4 konnte mit beiden eingesetzten Antikörpern das AF4-Protein deutlich nachgewiesen werden. Das der4 Protein hingegen ließ sich nur schwach mit dem NPM-Antikörper nachweisen. NPM1 ist somit eindeutig ein Interaktionspartner von AF4. Da NPM1 in den nLC-MALDI-MS/MS-Experimenten von der4 mit nur einem Peptid identifiziert wurde und auch nur schwach im Western Blot auf die Strep-Elution von der4 und in der Co-IP nachweisbar war, ist die Interaktion zwischen NPM1 und dem der4-Komplex nicht eindeutig. Wenn überhaupt, so liegt eine schwache Interaktion vor.

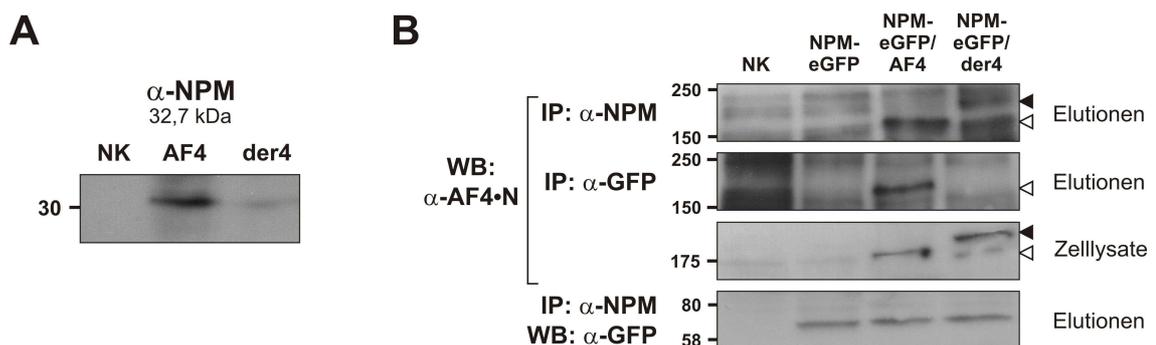


Abbildung 4-11: Nachweis von NPM als Komplexbpartner

(A) Western Blot der Strep-Elutionen von AF4, der4 und der Negativkontrolle (NK),

(B) Co-IP von NPM-GFP mit AF4 bzw. der4. Oberes Bild zeigt die Co-IP mit α -NPM gefolgt von dem Bild der Co-IP mit α -GFP. Danach sind die einzelnen Zelllysate abgebildet zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion von AF4 und der4. Das untere Bild dient als Nachweis der Transfektion von NPM-GFP. Schwarze Pfeile markieren die Bande von der4 und die weißen Pfeile zeigen auf das AF4-Protein.

Des Weiteren konnten durch die IP-Experimente DDX6, HEXIM1 und NF κ B1 als AF4-Komplexpартner nachgewiesen werden. Der Blot zeigte schon nach kurzer Expositionsdauer eine deutliche Bande auf der Höhe von AF4. Für der4 konnten HEXIM1 und NF κ B1 als Interaktionspartner bestätigt werden. DDX6 scheint auch mit der4 zu interagieren, aber die Bande von der4 im Western Blot der IP ist sehr dünn, so dass anscheinend nur eine schwache Interaktion mit der4 stattfindet. Generell ist auffällig, dass die Banden von der4 in den IP-Experimenten immer schwächer sind als solche von AF4. Vielleicht lassen sich – aufgrund der Größe des der4-Proteins – Interaktionen mittels Immunopräzipitation schwerer nachweisen.

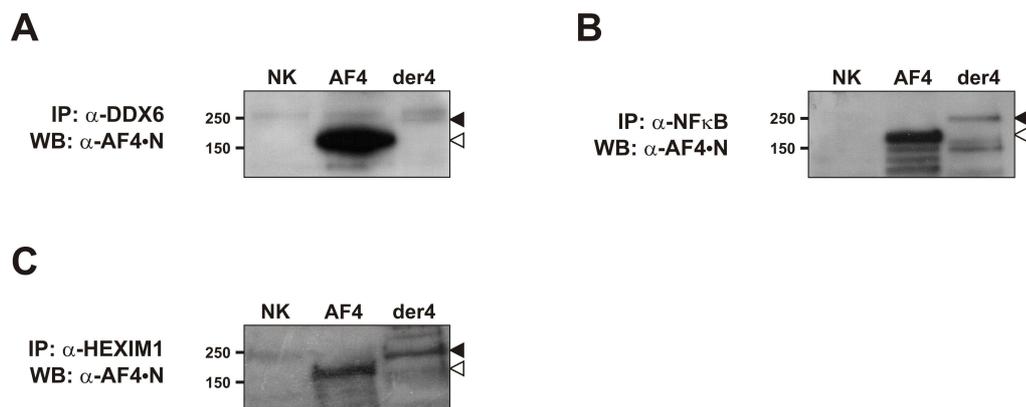


Abbildung 4-12: Identifizierung von DDX6, NF κ B1 und HEXIM1 als Komplexpартner von AF4 und der4

IP mit α -DDX6 (A), α -NF κ B (B), α -HEXIM1 (C) und anschließender Nachweis von AF4 und der4 im Western Blot.

NK = Negativkontrolle bzw. untransfizierte 293T-Zellen; schwarze Pfeile markieren die Bande von der4 und die weißen Pfeile zeigen auf die Laufhöhe des AF4-Proteins.

Der Nachweis einer Interaktion von AF4 bzw. der4 mit dem BRD4-Protein gestaltete sich wie bereits im Kapitel 4.3.1 beschrieben schwierig. Um deshalb eine eindeutige Aussage über die Anwesenheit von BRD4 in einem der Komplexe machen zu können, wurde ein aus cDNA gewonnenes BRD4-Konstrukt gerichtet in den pcDNA3.1/Zeo-Vektor kloniert und anschließend noch ein GFP C-terminal *in frame* zum BRD4-Konstrukt eingefügt (Die komplette Klonierung dieses Plasmids wurden von Jennifer Merkens aus der Arbeitsgruppe von Prof. Marschalek durchgeführt.). Dieses BRD4-Konstrukt kodiert für die ersten 500 Aminosäuren des BRD4-Proteins. Sie beinhalten die beiden Bromodomänen von BRD4 und eine Kernlokalisierungssequenz. Laut Literatur findet die Interaktion mit CCNT1 über diese Domänen statt. Somit sollte diese Sequenz von BRD4 ausreichend sein, um eine Interaktion mit AF4 oder der4 nachzuweisen (Jang et al., 2005; Wu & Chiang, 2007). Der Vorteil dieses Plasmids ist, dass die Laufhöhe des kodierten Proteins bei ungefähr 110 kDa liegt und sich somit deutlich von der AF4-Laufhöhe unterscheidet. Außerdem kann aufgrund des GFP-Tags auch noch zusätzlich ein

Versuch mit einem GFP-Antikörper durchgeführt werden, der keine Kreuzreaktivität mit dem AF4-Protein aufweist.

Das AF4-Plasmid pEXPR-IBA-103-AF4 oder das der4 Plasmid pEXPR-IBA-103-der4 wurden gemeinsam mit dem Plasmid pcDNA3.1-Brd4-GFP in 293T-Zellen transfiziert. Für die Co-Immunopräzipitation wurde entweder der GFP-Antikörper eingesetzt, oder in einem zweiten Ansatz der BRD4-Antikörper, der keine Kreuzreaktivität zu AF4 im Western Blot zeigte. Das Ergebnis dieses Versuchs konnte BRD4 als Komplexpartner für das AF4-Protein bestätigen. Die Interaktion mit der4 war hingegen negativ.

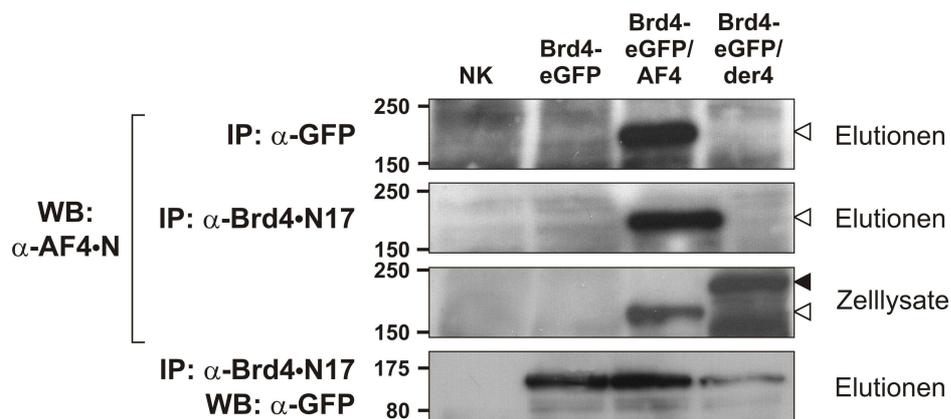


Abbildung 4-13: Nachweis der Interaktion von Brd4 mit AF4

Das obere Bild zeigt die Co-IP mit α -GFP und darunter befindet sich die Co-IP mit dem Brd4-N17-Antikörper. Danach sind die einzelnen Zellysate abgebildet zum Nachweis der erfolgreichen Transfektion von AF4 und der4. Das untere Bild dient als Nachweis der Transfektion von BRD4-GFP der schwarze Pfeil markiert die Bande von der4 und die weißen Pfeile zeigen auf das AF4-Protein.

4.4 *In vitro* Histon-Methyltransferase-Assay

Der *in vitro* Histon-Methyltransferase-Assay sollte zeigen, ob die isolierten Komplexe aktiv sind, d.h. eine Methyltransferase-Aktivität besitzen und somit in der Lage sind, das Histon H3 zu methylieren. Laut Literatur (Wysocka et al., 2005, Nagy et al., 2002) sollte der4 aufgrund seiner C-terminal gelegenen SET-Domäne vom MLL-Teil und den daran assoziierten Proteinen Ash2L, WDR5 und RbBP5 in der Lage sein, das Lysin4 des Histons H3 zu trimethylieren. Für den AF4-Komplex wird eine H3K79-Trimethylierung vermutet aufgrund der Anwesenheit der Methyltransferase DOT1L im Komplex.

Für diesen Versuch wurden die Strep-Elutionen der Säulenreinigung eingesetzt. Es gab zwei verschiedene Ansätze: Beim ersten Ansatz wurden die Elutionen mit gereinigten Nukleosomen der Firma Upstate inkubiert. Beim zweiten Ansatz wurde ein gereinigtes, aus Bakterien gewonnenes GST-H3-Peptid (Aminosäuren 1-46 des humanen Histons H3; von Julia Herglotz

aus der Arbeitsgruppe von Dr. Lausen am Georg-Speyer-Haus zur Verfügung gestellt) zu den Elutionen gegeben. Beide Ansätze wurden mit Tritium markiertem S-Adenosyl-Methionin behandelt und anschließend zum Abstoppen der Reaktion mit Ladepuffer versetzt. Nach der Auftrennung der Proben über ein SDS-Gel, wurde dieses fixiert und mit Enhancer-Lösung behandelt, bevor es gewaschen und getrocknet werden konnte. Das getrocknete Gel wurde abschließend in eine Röntgenkassette geklebt und ein Röntgenfilm für ungefähr jeweils 1 bis 4 Wochen aufgelegt. Die Kassette wurde in dieser Zeit bei -80°C gelagert (genaues Protokoll siehe Kapitel 6.5.6).

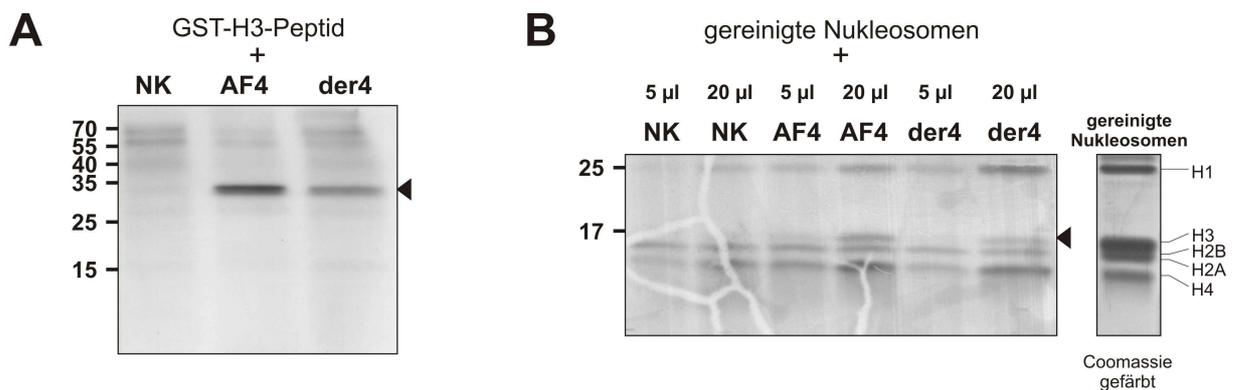


Abbildung 4-14: *In vitro* Histon-Methyltransferase-Aktivität der gereinigten Proteinkomplexe von AF4 und der4

(A) *In vitro* HMT-Assay mit einem rekombinanten GST-H3-Peptid (Aminosäuren 1-46)

30 μl des Peptids wurden mit 15 μl gereinigtem Komplex inkubiert. Nur für den AF4- und den der4-Komplex ist eine deutliche Bande auf der Laufhöhe des Peptids sichtbar (markiert mit einem Pfeil).

(B) *In vitro* HMT-Assay mit gereinigten Nukleosomen

5 μl gereinigte Nukleosomen vom Huhn (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurden mit 5 oder 20 μl gereinigtem Komplex inkubiert. Nur für den AF4- und der4-Komplex konnte eine *in vitro* HMT-Aktivität spezifisch für Histon H3 gezeigt werden (siehe Markierung mit dem Pfeil). Die Banden von H1, H2A/B und H4 sind auch in der Negativkontrolle sichtbar, was die Anwesenheit von unspezifisch mitgereinigten Enzymen zeigt, die nicht Teil des Komplexes von AF4 oder der4 sind. Das kleine Bild ganz rechts zeigt die Laufhöhen der gereinigten Nukleosomen nach Färbung des Gels mit Coomassie-Lösung und dient als Laufhöhenreferenz.

Sowohl für den AF4- als auch für den der4-Komplex konnte mit den gereinigten Nukleosomen eindeutig eine Methylierung des Histons H3 nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle (NK) zeigt keine Bande auf der Laufhöhe von H3. Die Vermutung der H3K4-Trimethylierung durch den der4-Komplex und die Vermutung der H3K79-Trimethylierung durch den AF4-Komplex scheinen sich somit zu bestätigen. Auch der zweite Ansatz mit dem GST-H3-Peptid zeigte für AF4 und für der4 eine deutliche Bande auf Laufhöhe des Peptides und somit eine Methylierung des H3s an seinen ersten 46 Aminosäuren. Damit wird die H3K4-Trimethylierung für der4

abermals bekräftigt, während dieses Ergebnis überraschend für AF4 ist, da bislang keine Methylierung der ersten 46 Aminosäuren des Histons H3 durch das AF4 selbst oder durch einen seiner Komplexpartner in der Literatur beschrieben wurde. Damit stellt sich die Frage, ob ein bereits bekannter Komplexpartner des AF4s oder das AF4 selbst diese Methylierung herbeiführt oder ob ein noch nicht bekannter Interaktionspartner des AF4s dafür verantwortlich ist. Leider kann hier keine generelle Aussage über die genaue Position der Methylierung gemacht werden – weder für AF4 noch für der4 – und ob es sich dabei um eine Mono-, Di- oder Trimethylierung handelt. Allerdings zeigt dieser Versuch eindeutig, dass die Komplexe nach ihrer Reinigung noch biologisch aktiv sind.

4.5 Isolierung des ENL-Proteins und Nachweis seiner Interaktionspartner

Das ENL-Protein stellt den bekanntesten Interaktionspartner von AF4 dar. Schon mehrere Publikationen konnten diese Interaktion nachweisen und haben die einzelnen Interaktionsdomänen beider Proteine näher betrachtet und lokalisiert. Auch für das ENL-Protein wurden bereits mehrere Interaktionspartner beschrieben. Dabei wurden im ENL-Komplex Proteine gefunden, die nicht im AF4-Komplex nachgewiesen werden konnten und denen zum Teil reprimierende als auch aktivierende Eigenschaften zugesprochen werden. Es stellt sich deshalb die Frage, ob das ENL-Protein in vielleicht zwei unterschiedlichen Komplexformen vorliegen kann – in einem aktiven und einem reprimierenden Zustand.

4.5.1 Reinigung von ENL über das Strep-Tag

Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde das ENL-Konstrukt aus dem pTARGET-Vektor mittels Restriktionsenzymen ausgeschnitten und in den pEXPR-IBA-103 eingesetzt. Auch in diesen Vektor wurde noch ein zusätzlicher N-terminaler Flag-Tag eingebracht. Damit war – wie bereits bei AF4 und der4 – eine Reinigung des Proteins mit seinen Interaktionspartnern über ein C-terminales Strep-Tag und eine Tandem-Reinigung über Strep- und Flag-Tag möglich. Die Transfektionsbedingungen und auch die Versuchsdurchführungen waren identisch zu den AF4- und der4-Reinigungen. Lediglich die Zugabe von MG 132 zu den Zellen wurde weggelassen, da ENL keinem proteasomalen Abbau unterliegt (Bitoun et al., 2007).

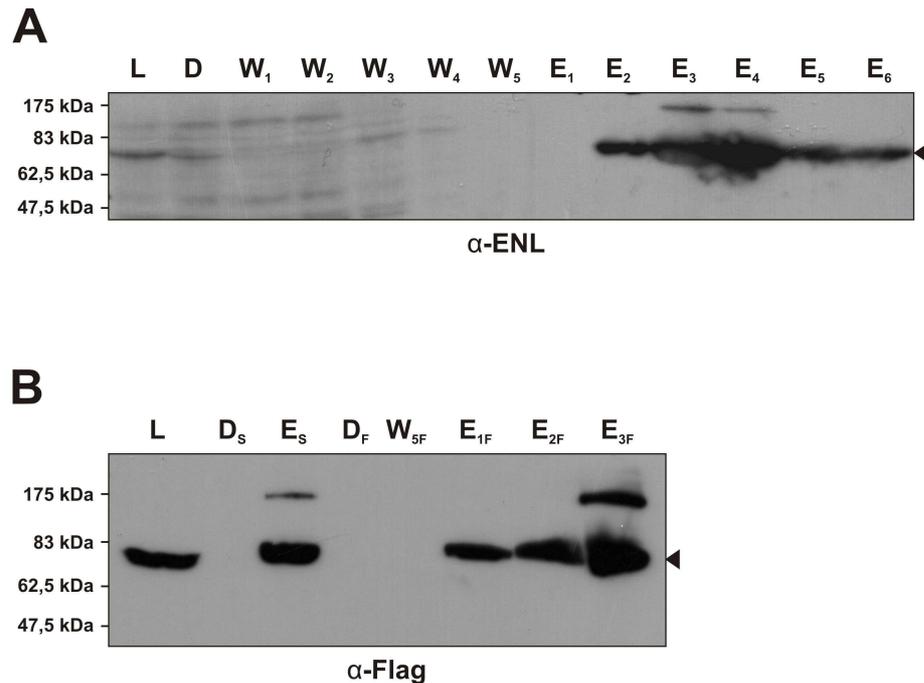


Abbildung 4-15: Reinigung des ENL-Proteins

(A) Western Blot einer Reinigung des ENLs über eine Strep-Tactin Säule.

(B) Western Blot mittels α -Flag Antikörper einer Tandem-Reinigung von ENL, bei der zunächst über den Strep-Tag und anschließend über den Flag-Tag gereinigt wurde.

Pfeile markieren die Proteinbanden von ENL.

4.5.2 Nachweis von ENL Komplexpartnern

Der Nachweis von Komplexpartnern erfolgte – wie bei AF4 und der4 – über zwei verschiedene Wege. Zunächst wurde mittels Western Blot die ENL-Elution auf die bekannten Komplexpartner hin untersucht. Dabei konnten die Proteine CDK9, CCNT1, RING1 und die RNA-Polymerase II nachgewiesen werden. Der Nachweis für AF4 fiel nicht eindeutig aus. Auch das Protein AF10 zeigte im Western Blot nur eine sehr schwache Bande, die nach dem Einscannen des Blots am Computer nicht mehr sichtbar war. Keine Bande konnte für die Proteine PC3, N-CoR, CCNT2 und DOT1L gezeigt werden, obwohl zum Beispiel für DOT1L eine eindeutige Interaktion mit ENL in der Literatur beschrieben ist (Zeisig et al., 2005; Mueller et al., 2007). Da die beiden Proteine CDK9 und CCNT1 im ENL-Komplex vorhanden sind, wurde die Elution auch noch auf die Proteine NPM1 und NF κ B1 getestet. Dabei konnte das Protein NF κ B1 nachgewiesen werden, wobei eine Bande in der Negativkontrolle auftauchte, die vermutlich durch ein Überlaufen der ENL-Elution in die benachbarte Tasche des SDS-Gels entstanden ist. Der NPM1-Blot zeigte keine Bande. Um das positive Ergebnis für NF κ B1 zu bestätigen, wurde dessen Interaktion mit ENL in einem IP-Experiment nachgewiesen.

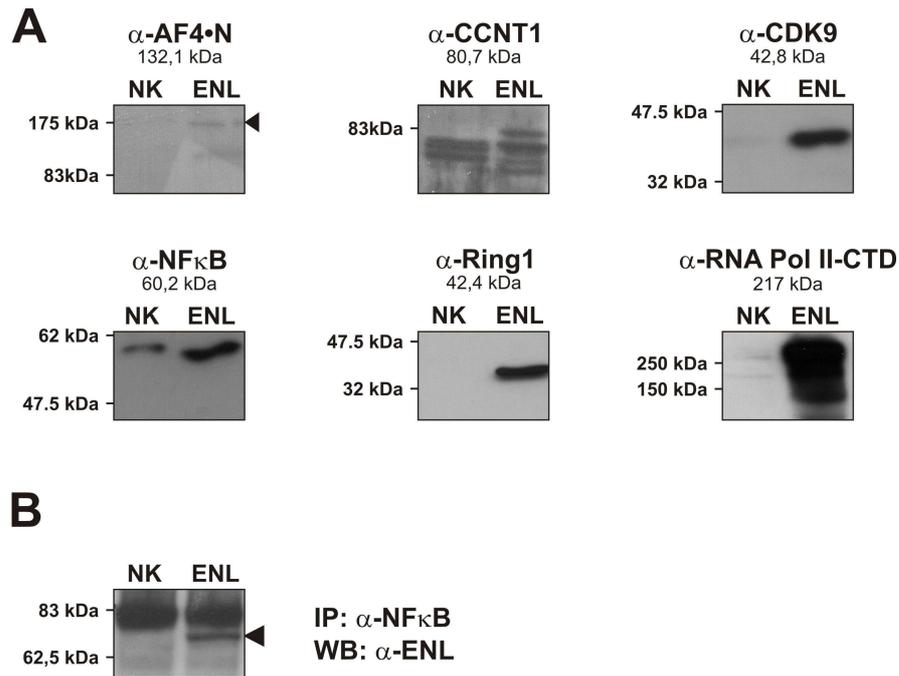


Abbildung 4-16: Komplexpартner des ENL-Proteins

(A) Mittels Western Blot auf die Strep-Reinigung nachgewiesene Komplexpартner von ENL. Der schwarze Pfeil markiert die sehr schwache Bande von AF4

(B) Nachweis der Interaktion von NF κ B1 mit ENL. Schwarzer Pfeil markiert die ENL-Bande.

In einem zweiten Ansatz wurde die ENL-Elution einem tryptischen Lösungsverdau unterzogen und im Anschluss mittels nHPLC-MALDI-MS/MS-Messungen untersucht. Die Durchführung war analog zur Messung der AF4- und der4-Elutionen.

Leider konnten dabei keine Interaktionspartner nachgewiesen werden, obwohl dieses Experiment sechsmal wiederholt wurde. Es wurde lediglich das ENL sehr deutlich mit einer großen Anzahl an Peptiden identifiziert. Mögliche Erklärungsansätze werden später in der Diskussion angesprochen.

4.5.3 Die Interaktion von ENL mit AF4

Das schwache Western Blot Ergebnis für AF4 war verwunderlich. Eine Erklärung könnte aber sein, dass es sich hierbei um endogenes AF4 handelt und die ENL transfizierten Zellen nicht mit einem Proteasominhibitor behandelt wurden. Deshalb wurden noch einmal 293T-Zellen mit dem Plasmid pEXPR-IBA-103-ENL und dem Plasmid pTARGET-AF4 gemeinsam transfiziert und anschließend mit dem Proteasominhibitor MG 132 behandelt. Die Reinigung des ENL erfolgte mit der Strep-Tactin-Suspension.

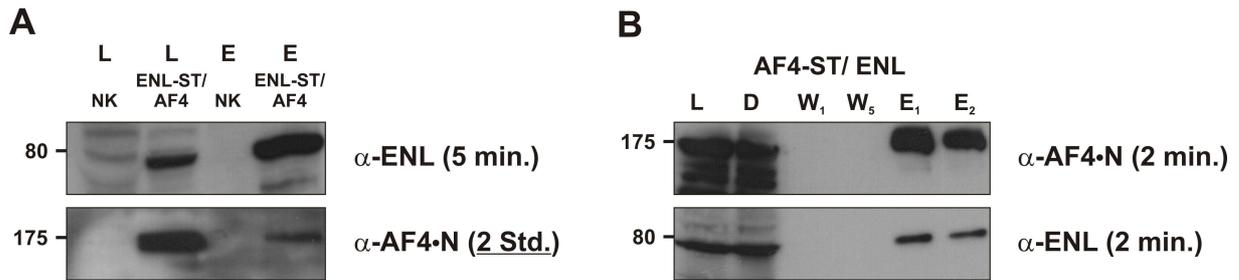


Abbildung 4-17: Western Blot der Interaktion von ENL mit AF4

(A) Reinigung einer Co-Transfektion von ENL-ST mit AF4 über das Strep-Tag von ENL.

(B) Reinigung über das Strep-Tag von AF4 einer Co-Transfektion von AF4-Strep mit ENL. Es handelt sich hierbei um die gleiche Reinigung wie in Abbildung 4-9.

In Klammern hinter den eingesetzten Antikörpern ist die Expositionszeit des Blots angegeben.

Hierbei konnte eine Interaktion von AF4 mit ENL zwar nachgewiesen werden, aber diese Interaktion war trotzdem wesentlich schwächer, als bei einer Co-Transfektion von AF4-ST mit ENL. In diesem Fall ist die mitgereinigte Bande von ENL sehr deutlich und schon nach kurzer Expositionszeit sichtbar (siehe Abbildung 4-17 B).

4.6 Stabilisiert ENL das AF4-Protein?

In der Publikation von Bitoun und ihren Kollegen 2007 wurde zum ersten Mal gezeigt, dass das ENL-Protein das AF4 stabilisieren kann und somit vor dem proteasomalen Abbau schützt. Diese Entdeckung würde bedeuten, dass bei einer Co-Transfektion beider Proteine demnach auf die Zugabe von MG132 verzichtet werden könnte. Die Zellen wären dem zu Folge etwas weniger Stress ausgesetzt und die Reinigung von AF4 könnte vielleicht verbessert werden. Es wurde deshalb zunächst untersucht, ob diese Stabilisierung des AF4s durch das ENL auch in 293T-Zellen stattfindet. Dazu wurde ein sehr ähnlicher Versuchsansatz wie in der Publikation gewählt. $2 \cdot 10^6$ 293T-Zellen wurden mit dem Expressionskonstrukt von Flag-AF4-Strep alleine transfiziert oder zusammen mit den Expressionskonstrukten von ENL und SIAH. Es wurde dabei kein Proteasominhibitor eingesetzt. Anschließend wurde mittels eines Flag-Antikörpers eine IP/Co-IP auf AF4 durchgeführt und versucht, im Western Blot das AF4-Protein nachzuweisen. Bitoun und Kollegen konnten zeigen, dass bei einer Co-Transfektion von AF4, SIAH und ENL der Abbau von AF4 verhindert wird im Gegensatz zu einer Co-Transfektion von AF4 mit SIAH alleine. Bei dieser Transfektion konnte im Western Blot anschließend kein AF4 nachgewiesen werden.

Unsere Experimente konnten das Ergebnis aus der Publikation überhaupt nicht bestätigen. Im ersten Versuchsansatz wurde von jedem Plasmid 10 μ g eingesetzt (Abbildung 4-18 A). Die aufgetragenen Lysate zeigen, dass die Transfektion für alle Proteine erfolgreich war und auch die

Menge an Protein ist in allen Lysat-Proben identisch, wie die Ladekontrolle mit dem Nachweis auf Aktin zeigt. Die Co-Transfektion von AF4 und SIAH bestätigt den Abbau von AF4 durch SIAH (keine Bande bei 175 kDa sichtbar). Bei der Transfektion von AF4 alleine und zusammen mit ENL ist dagegen die AF4 Bande gut sichtbar und auch die Intensitäten sind ähnlich. In der letzten Spur ist die Dreier-Transfektion von AF4, ENL und SIAH zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass keine Stabilisierung durch das ENL erfolgt, denn wie bei der AF4/SIAH-Co-Transfektion ist auch hier keine AF4-Bande sichtbar. Auch kann hier nicht von einer zu geringen Menge an ENL ausgegangen werden, denn im Lysat ist das ENL deutlich sichtbar.

Da mit steigender Plasmidmenge die Transfektionseffizienz abnimmt und die Zellen sehr gestresst werden – durch die dementsprechend höhere Menge an Transfektionsmittel – wurde in einem zweiten Versuchsansatz die Gesamtmenge an DNA pro Transfektion auf 10 µg festgelegt. Dies bedeutete bei einer Doppel-Transfektion 5 µg pro Plasmid und bei der Dreier-Transfektion nur 3,33 µg pro Plasmid. Im Lysat konnte bei der Co-Transfektion von AF4 mit ENL somit weniger AF4 nachgewiesen werden und auch bei der Dreier-Transfektion von AF4, ENL und SIAH ist die Menge an SIAH geringer als bei der Co-Transfektion von SIAH mit AF4 (Abbildung 4-18 B, Lysate). Die IP mit dem Flag-Antikörper zeigte aber wieder das gleiche Resultat wie beim ersten Versuchsansatz. Auch die geringe Menge an SIAH reichte aus, um trotz gleichzeitiger Anwesenheit von ENL das AF4-Protein effektiv abzubauen.

Diese Versuche widerlegen damit das Ergebnis aus der Publikation von Bitoun und ihren Kollegen. Die Interaktion von AF4 mit ENL kann das AF4 nicht vor dem proteasomalen Abbau durch SIAH schützen.

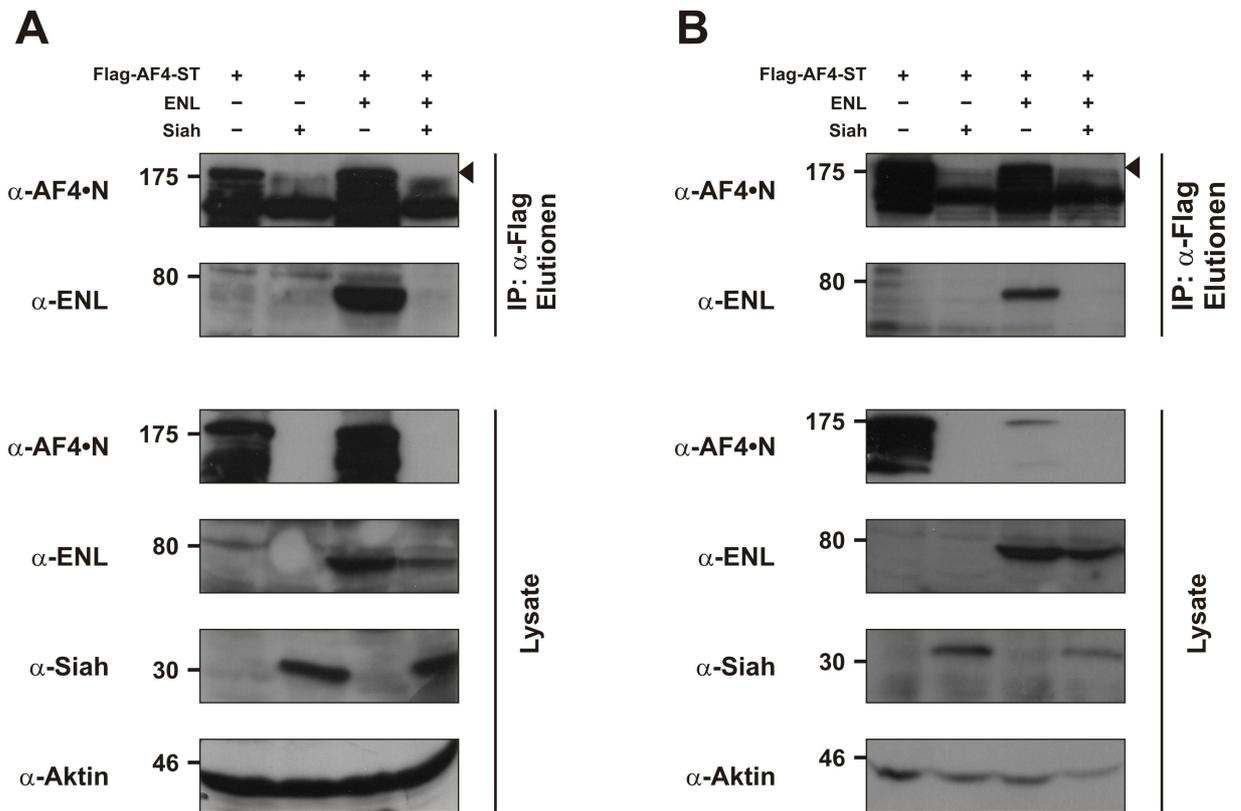


Abbildung 4-18: Untersuchung der Stabilisierung des AF4-Proteins durch Interaktion mit ENL

Western Blot der verschiedenen Transfektionskombinationen und der anschließenden IP/ Co-IP mittels Flag-Antikörper. Das Transfektionsschema ist über den Western Blot Bildern aufgeführt. Die schwarzen Pfeile markieren die Laufhöhe des AF4-Proteins.

(A) Es wurden 10 µg von jedem Plasmid eingesetzt.

(B) Bei jedem Transfektionsansatz wurden insgesamt nur 10 µg Plasmid-DNA eingesetzt.

5 Diskussion

5.1 Zusammensetzung und Funktion des AF4-Komplexes

5.1.1 Die Identifizierung der AF4-Komplexparker

Die Identifizierung der einzelnen Interaktionspartner des AF4-Proteins war schwieriger als zunächst erwartet. Die Transfektion und anschließende Reinigung über den Strep-Tag verliefen zwar problemlos, doch schon bei der Identifizierung der im SDS-Gel sichtbaren Banden mittels Gelverdau und anschließender MALDI-Massenspektrometrie traten die ersten Schwierigkeiten auf. Das AF4-Protein zeigte deutlich sichtbare Abbruchbanden bis zu einer Größe von 32 kDa im SDS-Gel. Diese Banden waren so dominant, dass eine Identifizierung der weniger abundanten Interaktionspartner aus dem Gel nicht möglich war, da in den meisten PMF-Spektren die höchsten Signale aus dem AF4-Protein stammten. Lediglich die deutlich sichtbaren Banden unspezifischer Proteine wie Aktin und HSP70 konnten mittels PMF-Analytik identifiziert werden.

Da bereits bekannt war, dass das AF4-Protein eine extrem hohe „Turn-over“-Rate aufweist, und durch seine hohe Abbaurate in normalen Zellen praktisch nicht nachweisbar ist, kann man davon ausgehen, dass das AF4-Protein auch in damit transfizierten Zellen nur sehr kurz als intaktes Protein vorliegt. Aufgrund der unterschiedlichen Reinigungsverfahren (Strep-Tactin-Säule oder Batch-Verfahren), die immer die gleichen Abbruchfragmente von AF4 zeigen, kann man sogar postulieren, dass zelluläre Proteasen stets an den gleichen Sequenzmotiven das AF4-Protein hydrolysieren können. Damit besitzt das AF4-Protein quasi spezifische „Sollbruchstellen“.

Die hohe AF4-Konzentration im Verhältnis zur Konzentration seiner mitgereinigten Interaktionspartner erschwerte deren Identifizierung mittels nLC-MALDI-MS/MS. Die AF4-Peptide waren so dominant vertreten, dass Peptide der Bindepartner nur sehr schwer und in geringen Mengen identifiziert werden konnten. Es waren mehrere LC-Läufe notwendig – im Vergleich zur der4-Reinigung – um die in Tabelle 4-1 identifizierten Proteine zu erhalten. Auffällig war außerdem, dass die AF4-Reinigung im Vergleich zur der4-Reinigung viel stärker mit cytosolischen Proteinen verunreinigt war. Vielleicht erfolgt der Kerntransport beim der4-Protein aufgrund seines MLL-C-Terminus wesentlich schneller als bei AF4. Eine Spleißvariante des *AF4*-Gens – das FELC Transkript – kodiert für ein ca. 400 Aminosäuren langes Protein ohne Kernlokalisationssequenz, und müsste demnach seine Funktion im Cytosol entfalten. Die Funktion dieses FELC-Proteins ist aber noch ungeklärt. Falls der AF4-N-Terminus eine Rolle im Cytosol spielt, so könnte eine Überexpression von AF4 zur Folge haben, dass dieses zunächst eine gewisse Zeit im Cytosol verbleibt. Mit Sicherheit kann aber nur gesagt werden, dass die

Überexpression von AF4 Reaktionen in der Zelle hervorruft, die vielfältig und komplexer Natur sein können.

5.1.2 Die Bedeutung der neuen Interaktionspartner für den AF4-Komplex

Der in dieser Arbeit über Affinitätschromatographie aus 293T-Zellen isolierte AF4-Komplex bestätigt und erweitert die bisher gewonnenen Ergebnisse über die zelluläre Funktion dieses Proteins. Größenausschlusschromatographie-Experimente ergaben, dass der AF4-Komplex ein Molekulargewicht von über 2 MDa aufweist. Die während dieser Arbeit identifizierten Komplexpartner sind aber nicht ausreichend, um dieses Gewicht zu erreichen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass noch weitere unbekannte Proteine mit dem AF4-Protein assoziiert vorliegen. Es wurden die bereits bekannten Interaktionspartner ENL/AF9, AF10, DOT1L, CDK9, CCNT1 und die RNA-Polymerase II identifiziert. Damit fungiert der AF4-Komplex auch in humanen Zellen als Stimulator der RNA Polymerase II abhängigen transkriptionellen Elongation und vermittelt eine DOT1L-abhängige H3K79-Methylierung, die einen aktiven Transkriptionsstatus aufrechterhält (Bitoun et al., 2007). Zusätzlich konnten 6 weitere Proteine identifiziert werden (AF5q31, BDR4, DDX6, HEXIM1, NFκB1/RELA und NPM1). Diese Proteine werden in folgendem Abschnitt genauer vorgestellt und es wird auf deren zelluläre Funktion und Bedeutung im Hinblick auf den AF4-Komplex eingegangen.

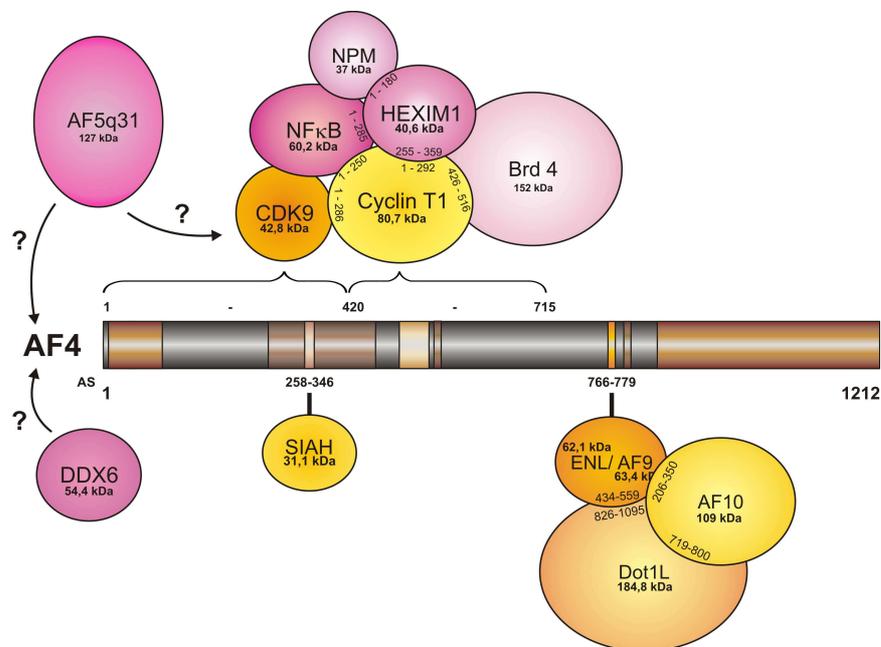


Abbildung 5-1: Zusammensetzung des AF4-Komplexes mit den neu identifizierten Interaktionspartnern
 Die neuen Interaktionspartner sind in rosa dargestellt und die Zahlen in den Proteinen geben deren Interaktionsbereich mit dem benachbarten Protein an. Die Interaktionsbereiche sind der Literatur entnommen. Die Fragezeichen deuten an, dass keine Aussagen über die genaue Lokalisation der Interaktion getroffen werden kann.

Eine sehr wichtige Komponente des AF4-Komplexes stellt der transkriptionelle Elongationsfaktor P-TEFb dar. Er setzt sich aus CDK9 und der regulatorischen Untereinheit CCNT1 zusammen, die als Heterodimer eine Kinasefunktion aufweisen (Peng et al., 1998; Wei et al., 1998). P-TEFb stimuliert generell transkriptionelle Prozesse, indem die Kinase-Domäne des CDK9-Proteins die C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II (RNA-Polymerase II CTD) am Serin 2 (Ser2) hyperphosphoryliert (Chao & Price, 2001; Shim et al., 2002). Die C-terminale Domäne besteht aus 52 Heptapeptid-Folgen der Konsensussequenz YSPTSPS und spielt eine wichtige Rolle im Transkriptions-Zyklus. Während jedes Zykluses interagiert sie mit vielen Transkriptionsfaktoren und unterzieht sich einer dynamischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung (Dahmus, 1996). Die Hyperphosphorylierung am Ser2 der C-terminalen Domäne durch P-TEFb bzw. CDK9 erlaubt der RNA-Polymerase II den Wechsel aus der Präinitiationsphase/frühen Elongationsphase in die produktive, elongative Phase der Transkription.

Die Aktivität der P-TEFb Kinase wird dabei von positiven und negativen Faktoren reguliert. Es konnte nachgewiesen werden, dass zirka 50% des in der Zelle vorhandenen P-TEFb's durch Bindung an HEXIM1/7SK snRNA in einem inaktiven Zustand vorliegt. Das HEXIM1-Protein inhibiert die Kinase-Aktivität von P-TEFb, wobei der inhibitorische Effekt von der Anwesenheit der 7SK snRNA abhängig ist (Yik et al., 2003; Michels et al., 2004). Die Interaktion von HEXIM1 mit P-TEFb konnte auf eine C-terminale Region, die Cyclin-T-Bindedomäne (AS 255-359), im HEXIM1-Protein mit den Cyclin Boxen von CCNT1 (AS 1-292) eingeschränkt werden (Schulte et al., 2005). Ergänzend konnte auch eine Interaktion von HEXIM1 mit dem Protein N-CoR belegt werden. N-CoR fungiert zusammen mit der Histondeacetylase HDAC3 als Repressor verschiedener Transkriptionsfaktoren. In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, dass die Acetylierung von CDK9 am Lysin 44 dessen Fähigkeit erhöht, die C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II zu phosphorylieren (Fu et al., 2007). Die restlichen 50% des in der Zelle befindlichen P-TEFbs liegen zusammen in einem aktiven Komplex mit dem Bromodomänen-Protein BRD4 vor, wobei die Interaktion über das CCNT1-Protein stattfindet (Jang et al., 2005). BRD4 wird ubiquitär exprimiert und bindet über seine beiden Bromodomänen an acetylierte Histone (H3 und H4; Zeng & Zhou, 2002; Dey et al., 2003). Dadurch werden BRD4/P-TEFb-Komplexe an verschiedene Promotoren rekrutiert und vermitteln dort die Aktivierung von RNA-Polymerase II und die anschließend stattfindende transkriptionelle Elongation (Jang et al., 2005; Yang et al., 2005). Außerdem spielt es eine Rolle bei der Regulation des Zellwachstums (Maruyama et al., 2002; Farina et al., 2004) und bleibt während der Mitose an Chromosomen gebunden. Diese Eigenschaft von BRD4 wird als eine Schlüsselfunktion in der Übertragung des epigenetischen Gedächtnisses während der Zellteilung betrachtet (Dey et al., 2000; Kanno et al., 2004). Eine neue Studie zeigt, dass das BRD4-Protein P-TEFb zu Chromosomen in der späten

Mitose rekrutiert und damit die Expression von Schlüsselgenen in der G₁-Phase und die Entwicklung des Zellzykluses fördert (Yang et al., 2008).

AF4 hat demnach über die Interaktion mit P-TEFb einen bedeutenden Einfluss auf die Regulation der Genexpression. Interessant ist auch die Tatsache, dass neben P-TEFb auch die beiden Regulatoren HEXIM1 und BRD4 in den AF4-Reinigungen nachgewiesen werden konnten. Dies lässt vermuten, dass der AF4-Komplex in einem aktiven und in einem inaktiven Stadium vorliegen kann. Die Reinigung erfasst vermutlich verschiedene Stadien des AF4-Komplexes und eine Co-Existenz von BRD4 und HEXIM am P-TEFb ist aufgrund der obigen Ausführungen auszuschließen. Die Interaktion mit BRD4 führt zusammen mit P-TEFb zu einem aktiven AF4-Komplex. Es erleichtert diesem die Bindung an acetyliertes Chromatin und damit an dessen Zielgene. Demnach resultiert kein aktives P-TEFb durch die Bindung mit AF4, wie von Bitoun und Kollegen angenommen wurde (siehe dazu Kapitel 2.3.4 und Abbildung 2-8), sondern die Anwesenheit von BRD4 oder HEXIM1 am AF4/P-TEFb-Komplex entscheidet über dessen Status. Es zeigt sich, dass neben der strengen Regulation der AF4-Proteinmenge über die Interaktion mit SIAH-Proteinen, die Aktivität von AF4 in der Zelle zusätzlich über die Interaktion mit P-TEFb und dessen Regulatoren kontrolliert wird.

Des Weiteren konnte das Protein NFκB1/RELA im AF4-Komplex nachgewiesen werden. Es gehört zur Familie der NFκB/REL-Transkriptionsfaktoren, deren gemeinsames Kennzeichen eine Domäne von etwa 300 Aminosäuren ist, die sogenannte REL-Homologie-Domäne (Hoffman et al., 1999). Mitglieder der NFκB/REL-Familie sind unter anderem an der Regulation des Wachstums, der Transformation und der Apoptose von Zellen beteiligt. Jeweils zwei Untereinheiten können in unterschiedlichen Kombinationen aneinander binden und auf diese Weise Homo- bzw. Heterodimere ausbilden. Der Name NFκB wurde ursprünglich für das Heterodimer zwischen RelA (p65) und p50 verwendet und stellt das bedeutendste Mitglied dieser Familie dar (Barkett & Gilmoer, 1999). In seiner inaktiven cytosolischen Form liegt das Heterodimer gebunden an IκB vor. Als Reaktion auf eine ganze Reihe von Stimuli (z.B. Wachstumsfaktoren, Hormone, Stress etc.) erfolgt die Aktivierung der IκB-Kinase, die ihrerseits das IκB an zwei spezifischen Serinen (Ser23 und Ser36) phosphoryliert, was zur Polyubiquitinierung von IκB und anschließend zu seiner Degradierung führt (Goesh et al., 1998; Karin & Ben-Neriah, 2000). Das nun freigelegte Kernlokalisierungssignal von NFκB führt zu dessen Translokation in den Zellkern und zur Bindung an die Promotoren seiner Zielgene (Karin & Ben-Neriah, 2000). Nach dem Abbau von IκB wird RelA am Ser276 von der Protein-Kinase A bzw. am Ser592 von der Casein-Kinase II phosphoryliert, was wiederum zu einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität von NFκB führt (Zhong et al., 1997; Wang et al., 2000). Eine

Phosphorylierung an Ser276 ist notwendig, um mit dem transkriptionellen Aktivator CBP/p300 zu interagieren (Zhong et al., 1998).

NFκB benötigt außerdem P-TEFb zur Aktivierung der Transkription. Untersuchungen mit Hilfe eines P-TEFb-Inhibitors zeigten, dass pTEFb für die NFκB-abhängige Transkription antiapoptotischer Gene notwendig ist. Die Interaktion konnte dabei auf die ersten 250 Aminosäuren von CCNT1 beschränkt werden (Barboric et al., 2001). Während HEXIM1 die NFκB-abhängige Genexpression unterdrückt (Ouchida et al., 2003), belegen neuere Studien, dass BRD4 an das acetylierte Lysin 310 von RelA bindet und auf diese Weise als Co-Aktivator von NFκB fungiert, was sich in einer verstärkten Expression einiger NFκB-abhängiger Entzündungsgene widerspiegelt (Huang et al., 2008).

Die Interaktion von NFκB1/RELA mit dem AF4-Komplex findet vermutlich über die Interaktion mit P-TEFb und BRD4 statt. Der AF4-Komplex könnte demnach vielleicht über den NFκB-Signalweg reguliert oder aber auch durch die Anwesenheit von NFκB1 an dessen Zielgene rekrutiert werden. Für AF4 konnte bereits gezeigt werden, dass es einen Einfluss auf das Zellwachstum hat und bei Überexpression zur Wachstumstransformation der Zelle beiträgt (Bursen et al., 2004). Es wäre aber jetzt interessant zu wissen, ob diese Transformation unter anderem durch eine erhöhte Expression antiapoptotischer NFκB1-Zielgene zustande kommt. Außerdem müsste untersucht werden, ob z. B. die Stimulation der Zellen mit TNF-α neben der Aktivierung von NFκB1 auch einen Einfluss auf den AF4-Komplex hat. Des Weiteren könnte das Protein CBP über die Interaktion mit NFκB1 am AF4-Komplex beteiligt sein. Dies würde bedeuten, dass der AF4-Komplex neben der DOT1L vermittelten H3K79-Methyltransferaseaktivität auch über CPB an der Acetylierung von Histonen beteiligt ist. Der AF4-Komplex könnte dem zu Folge durch Acetylierung und Methylierung einen aktiven Chromatinstatus aufrechterhalten. Einen kleinen Hinweis auf die mögliche Anwesenheit von CBP im AF4-Komplex konnte mit einem Antikörper gegen CBP auf die Strep-Elutionen von AF4 und der4 erhalten werden. In der AF4-Spur war eine schwache Bande erkennbar. Das Ergebnis war aber für AF4 nicht reproduzierbar und auch die massenspektrometrischen Ergebnisse lieferten keinen Hinweis auf die Anwesenheit von CBP.



Abbildung 5-2: Ergebnis des CBP-Western Blots auf die Strep-Elutionen von AF4 und der4

NPM1 (Nukleophosmin; auch bekannt als B23, NO38 oder Numatrin) ist ein ubiquitär exprimiertes Phosphoprotein, das kontinuierlich zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma pendelt (Borer et al., 1989) und zur Neoplasmin-Familie nukleärer Chaperone gehört (Schmidt-Zachmann et al., 1987; Eirin-Lopez et al., 2006). Es ist an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt. Es assoziiert mit DNA und RNA (Dumba et al., 1989) und ist in der Lage, mit anderen Proteinen wie Nucleolin oder p120 zu interagieren (Valdez et al., 1994; Li et al., 1996). Es besitzt eine Ribonukleaseaktivität, die vermuten lässt, dass es an der Biogenese der Ribosomen (Herrera et al., 1995; Savkur et al., 1998) beteiligt ist. Außerdem verhindert NPM1 die falsche Faltung und Aggregation von Zielproteinen, indem es als molekulares Chaperon agiert (Szebeni & Olson, 2001). Eine wichtige zelluläre Funktion von NPM1 ist seine Histon-Chaperon-Aktivität, mit dessen Hilfe NPM1 am Chromatin-Auf- und Abbau beteiligt ist (Okuwaki et al., 2001). Des Weiteren konnte für NPM1 belegt werden, dass es in der Duplikation des Centrosoms involviert ist (Okuda et al., 2000) und eine zell-schädliche Verdopplung des Centrosoms während des Zellzyklus verhindert (Wang et al., 2005).

Weitere Studien sprechen dem NPM1 auch eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung zu. So führt die Inaktivierung des *Npm1*-Gens in Mäusen zu embryonaler Letalität und ein haploider Mangel an Npm1-Protein führte zu einer uneingeschränkten Verdopplung des Centrosoms. Damit ist die Proteinmenge an Npm1-Protein kritisch und trägt physiologischerweise zur genomischen Stabilität bei (Grisendi et al., 2005). Im Umkehrschluss tragen mutierte NPM1-Proteine zur genomischen Instabilität bei. Ein mutiertes *NPM1*-Gen ist die häufigste Mutation in AML Patienten, wobei die bisher charakterisierten Mutationen zu einer cytoplasmatischen Lokalisation des NPM1-Proteins führen (Grummit et al., 2008). Zudem ist das *NPM1*-Gen selbst in chromosomale Translokationen bei Leukämien und Lymphomen verwickelt (Morris et al., 1994; Redner et al., 1996; Yoneda-Kato et al., 1996). Neue Untersuchungen belegen eine Veränderung des Expressionsmusters spezifischer miRNAs, wenn das *NPM1*-Gen mutiert ist (Garzon et al., 2008).

Im Hinblick auf den AF4-Komplex ist es interessant, dass eine Interaktion zwischen NPM1 und NFκB nachgewiesen werden konnte (Dhar et al., 2004). Darüber hinaus scheint NPM1 über die Interaktion mit NFκB, pRB und E2F1 generell an der Transkription früher Zellzyklusgene beteiligt zu sein (Lin et al., 2006). Im Kontext mit dem AF4-Komplex ist interessant, dass NPM1 den proteasomalen Abbau von HEXIM1 initiieren kann, und damit die Kinase-Aktivität von P-TEFb beeinflusst.

Die Interaktion von NPM1 kann sowohl mit AF4 als auch über NFκB oder P-TEFb stattfinden. Die Frage, die sich nun ergibt ist, ob NPM1 konstitutiv an den AF4-Komplex bindet oder ob NPM1 nur für den Abbau des HEXIM1-Proteins an den AF4-Komplex rekrutiert wird. Diese Frage lässt sich mit dem momentanen Kenntnisstand nicht eindeutig beantworten. Ist HEXIM1

aus dem AF4-Komplex entfernt, so kann die Bindung von BRD4 erfolgen und damit den „inaktiven“ AF-Komplex in einen „aktiven“ AF4-Komplex verwandeln. Eine andere Möglichkeit stellt die grundlegende Stabilisierung des Komplexes durch NPM1 dar, da es auch als molekulares Chaperon fungieren kann, und somit Fehlfaltungen und Aggregationen verhindert.

Über das Protein AF5q31 ist bis heute nicht sehr viel bekannt. Es gehört wie AF4 zur ALF-Familie (Nilson et al., 1997) und ist auch in chromosomale Translokationen mit dem *MLL*-Gen verwickelt (Taki et al., 1999). Außerdem konnte 2002 gezeigt werden, dass es mit P-TEFb assoziiert vorliegt (Estable et al., 2002). Weitere Untersuchungen belegten, dass auch AF5q31 im Zellkern lokalisiert ist und dort die HIV-1 Tat-Transaktivierung unterdrückt (Niedzielski et al., 2007). Es bleibt offen, welche Rolle dieses Protein im AF4-Komplex einnimmt. Auch über die genaue Interaktion kann keine präzise Aussage getroffen werden, denn es besteht die Möglichkeit, dass AF5q31 über P-TEFb mit AF4 interagiert oder aber möglicherweise mit AF4 ein Heterodimer bildet. Bis heute gibt es allerdings keine Erkenntnisse darüber, ob Mitglieder der ALF-Familie in der Lage sind Homo- oder Heterodimere auszubilden.

Das letzte neu entdeckte Mitglied des AF4-Komplexes ist DDX6. Dieses Protein ist in den *P-Bodies* (*Processing bodies*) im Cytoplasma lokalisiert. Es ist am Abbau von mRNA beteiligt und spielt vermutlich eine Rolle beim mRNA-*Decapping*. Außerdem interagiert es mit Proteinen, die die Protein-Translation kontrollieren. Kürzlich wurde zudem gezeigt, dass DDX6 in die Prozessierung von miRNA involviert ist (Chu et al., 2006). Obwohl in dieser Arbeit eine Interaktion mit DDX6 eindeutig nachgewiesen wurde, ist es dennoch fraglich, ob DDX6 ein echter Bindepartner des AF4-Komplexes darstellt. DDX6 ist im Cytosol lokalisiert und der AF4-Komplex entfaltet seine Wirkung im Zellkern. Allein aufgrund der natürlichen Lokalisation beider Proteine ist demnach eine solche Interaktion nicht einleuchtend. Eine Erklärung für diese Interaktion könnte allerdings sein, dass jedes Kernprotein zunächst einmal im Cytoplasma an den Ribosomen gebildet werden muss, bevor es aufgrund seiner Kernlokalisationssequenz in den Zellkern wandert. Da das AF4-Protein in 293T-Zellen überexprimiert wurde, befindet sich auch eine enorme Menge an AF4 im Cytoplasma, so dass deshalb eine Interaktion mit DDX6 ermöglicht wurde. Ob die Interaktion aber auch physiologisch stattfindet und dann auch außerhalb des Zellkerns eine Rolle spielt, ist mehr als fraglich.

5.1.3 Der AF4-Komplex besitzt Methyltransferase-Aktivität

Der bekannteste Interaktionspartner von AF4 ist das ENL-Protein. Über ENL findet die Interaktion mit AF10 und DOT1L statt. Aufgrund der Anwesenheit von DOT1L besitzt der AF4-Komplex eine H3K79-Methyltransferase-Aktivität und kann so einen offenen Chromatinstatus aufrechterhalten. Mit Hilfe eines *in vitro* Histon-Methyltransferase-Assays (HMT) konnte die Methyltransferase-Aktivität des AF4-Komplexes für das Histon H3 bestätigt werden. Das Reinigungsprotokoll über den Strep-Tag ermöglicht die Isolierung von nativen/aktiven Komplexen. Gereinigte Nukleosomen wurden dabei mit dem gereinigten Komplex und ³H-SAM (S-(5'-Adenosyl)-L-methionin-(methyl-³H)) inkubiert. Mit diesem *in vitro*-Versuch konnte allerdings nicht auf die genaue Position der Methylierung geschlossen werden. Ein ähnlicher Versuchsansatz mit einem rekombinanten H3-GST-Peptid (Aminosäuren 1-46 des humanen Histon H3) zeigte überraschenderweise, dass auch dieses Peptid vom AF4-Komplex *in vitro* methyliert wird. Dieses Ergebnis war interessant, denn keiner der bekannten AF4-Komplexpартner ist in der Lage das Histon H3 in den ersten 46 Aminosäuren zu methylieren. Es muss folglich noch ein unbekanntes Protein am AF4-Komplex für diese Art der Methylierung verantwortlich sein. Außerdem kann aufgrund dieses Ergebnisses nicht mehr davon ausgegangen werden, dass beim ersten Versuch mit intakten Nukleosomen die beobachtbare Methylierung nur auf eine DOT1L-abhängige H3K79-Methylierung zurückzuführen ist.

Methylierungen an Histon-Proteinen können neben Lysinresten auch Argininreste betreffen. Die Proteinfamilie, die für diese Form der Protein-Methylierungen verantwortlich ist, wird PRMTs genannt (*protein arginine N-methyltransferases*) und umfasst inzwischen 11 Mitglieder. Weitere Versuche müssen somit an die HMT-Ergebnisse für den AF4-Komplex angeschlossen werden, um das unbekannte Protein zu identifizieren und um eine eindeutig Aussage über die Art der Methylierung treffen zu können.

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die bekannten möglichen Methylierungen, die am Histon H3-Protein erfolgen können.

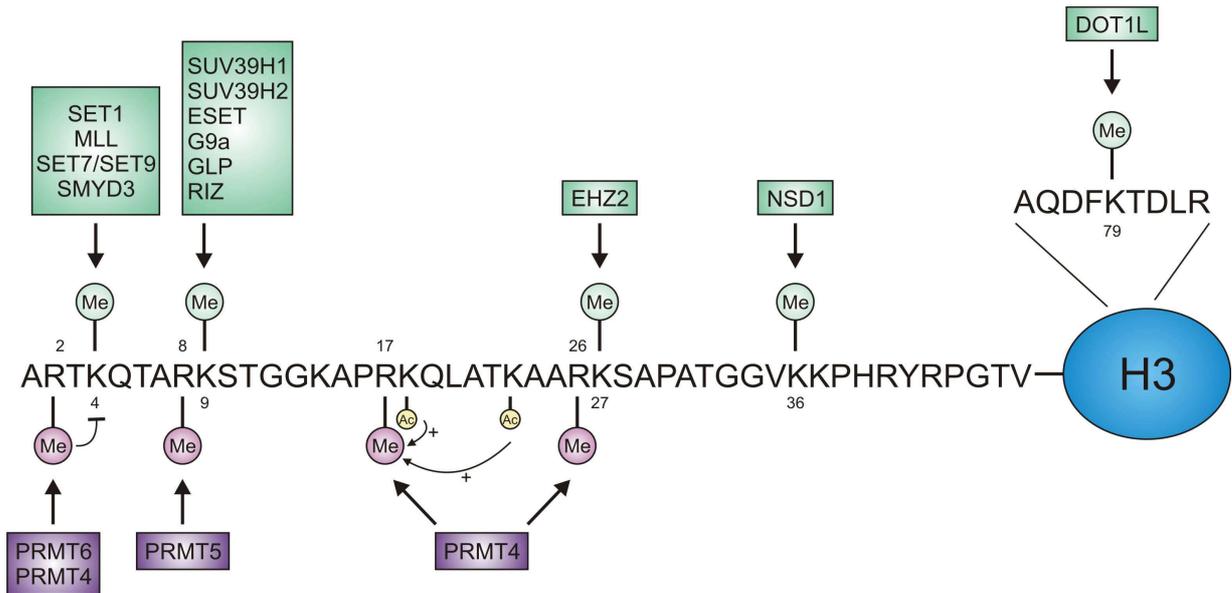


Abbildung 5-3: Humane Histone-Lysin/Arginin-Methyltransferasen mit ihren Methylierungsstellen am Histone H3

In grüner Farbe sind die Lysin-Methylierungen mit den verantwortlichen Lysin-Methyltransferasen abgebildet, wobei jeweils nur eine Spezies angegeben ist. Die Arginin-Methylierungen und die verantwortlichen PRMTs sind lila dargestellt. Eine Acetylierung am Lysin 18 bzw. 23 (gelb dargestellt) begünstigt die Methylierung am Arginin 17 durch PRMT4. Eine Methylierung am Arginin 2 durch PRMT6 verhindert die Methylierung des Lysins 4 (siehe dazu Martin & Zhang, 2005; Litt et al., 2009).

5.2 Zusammensetzung und Funktion des der4-Komplexes im Hinblick auf den pathomolekularen Mechanismus der t(4;11)-Translokation

Die Zusammensetzung des der4-Proteinkomplexes war bislang noch ungeklärt. Es wurde aber vermutet, dass auch das der4-Protein einen hochmolekularen Proteinkomplex ausbilden kann, da bereits für das MLL-Protein ein Multiproteinkomplex in der Literatur beschrieben war (Nakamura et al., 2002; Yokoyama et al., 2004); zudem wurden parallel zu den eigenen Arbeiten, erste noch unvollständige Ergebnisse zum AF4-Komplex publiziert (Bitoun et al., 2007). Erste Anzeichen für die Existenz eines der4-Komplexes lieferten die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie. Es konnte nachgewiesen werden, dass das der4-Fusionsprotein in den Fraktionen 8 bis 13 deutlich nachweisbar war. Diese Fraktionen entsprechen einem Molekulargewicht von über 2 MDa bis ca. 700 kDa. Das der4-Fusionsprotein hat ein berechnetes

Molekulargewicht von etwa 312 KDa und muss demnach mit anderen Proteinen assoziiert vorliegen. Weitere Untersuchungen konnten belegen, dass das der4-Protein sowohl mit Proteinen des AF4- als auch des MLL-Komplexes interagiert.

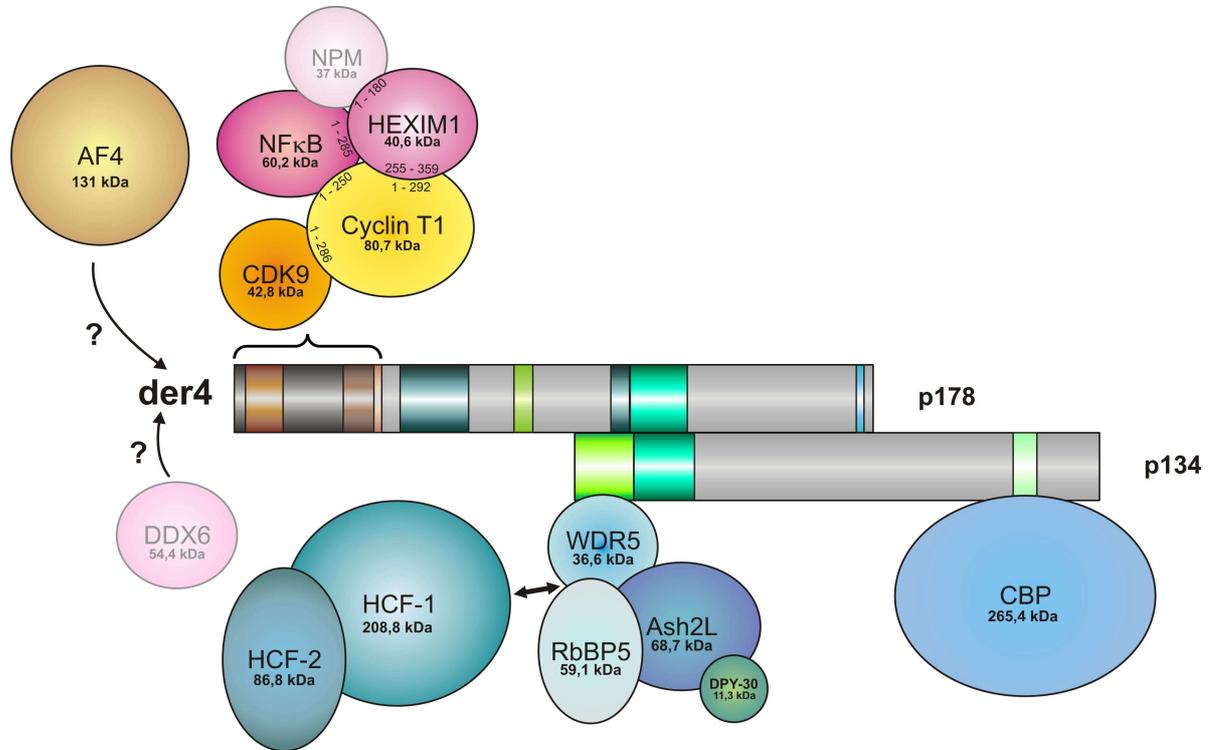


Abbildung 5-4: Zusammensetzung des der4-Komplexes

Die AF4-Interaktionspartner sind in rosa bzw. orange/gelb dargestellt und die MLL-Interaktionspartner in Blautönen. Die Zahlen in den Proteinen geben deren Interaktionsbereich mit dem benachbarten Protein an. Die Interaktionsbereiche sind der Literatur entnommen. Die Fragezeichen deuten an, dass keine Aussagen über die genaue Lokalisation der Interaktion getroffen werden kann. Eine sehr schwache Interaktion wird durch die graue Schrift und Umrandung des Proteins angedeutet.

Am MLL-C-Terminus des der4-Proteins konnte der komplette SET-Domänen-Komplex identifiziert werden (ASH2L, WDR5, RBBP5 und DPY-30) und *in vitro* Experimente belegen, dass der gereinigte der4-Komplex aufgrund dieser Interaktionspartner eine H3K4-Methyltransferaseaktivität besitzt (siehe Kapitel 4.4, Abbildung 4-14). Zusätzlich konnten auch die Proteine HCF-1, HCF-2 und CBP im Komplex nachgewiesen werden. Die Anwesenheit von CPB lässt zusätzlich eine Histon-Acetyltransferaseaktivität des der4-Komplexes vermuten, während über die Interaktion mit den beiden HCF-Proteinen ein Einfluss auf den Zellzyklus gegeben ist. Andere MLL-Komplexparker wie z.B. MOF1, RING2, GADD34 und INI1 konnten trotz verschiedener Versuche nicht nachgewiesen werden.

Über den AF4-Anteil im der4-Protein findet eine Interaktion mit P-TEFb, HEXIM1 und NFκB1/RelA statt. Damit ist das der4-Protein grundsätzlich in der Lage an RNA-Polymerase II zu binden, was in Western Blot Experimenten anschließend überprüft und validiert werden konnte (siehe dazu Abbildung 4-6). Jedoch konnte nur die inhibierende Komponente HEXIM1 – und nicht die aktivierende Komponente BRD4 – im der4-Komplex identifiziert werden. Demnach sollte keine P-TEFb-vermittelte Aktivierung der transkriptionellen Elongation der RNA-Polymerase II erfolgen. Außerdem konnte NPM1, das in der Lage wäre, den Inhibitor HEXIM1 abzubauen (Gurumurthy et al., 2008), nur sehr schwach als Interaktionspartner des der4-Protein nachgewiesen werden. Folglich scheint nur ein inaktiver P-TEFb-Kinase-Komplex mit dem der4-Protein zu interagieren. Allerdings zeigt eine induzierte Expression des der4-Proteins über 5 Tage eine signifikante, transkriptionelle Veränderung von 660 Genen, wobei 552 Gene transkriptionell aktiviert, aber nur 108 Gene herunterreguliert wurden (Gaussmann et al., 2007). Der der4-Komplex scheint demnach trotz des HEXIM1 Proteins einen enormen Einfluss auf transkriptionelle Prozesse zu haben. Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass der der4-Komplex das HEXIM1-Protein der Zelle entzieht und folglich das P-TEFb-Gleichgewicht in der Zelle massiv gestört wird. Dies könnte zu einer gesteigerten Expression P-TEFb-abhängiger Gene führen. Eine weitere Möglichkeit ist die Acetylierung des Lysins 44 von CDK9, die ebenfalls zu einer Aktivierung von P-TEFb führt (Fu et al., 2007) und damit dem der4-Komplex einen Einfluss auf die transkriptionelle Elongation der RNA-Polymerase II ermöglicht. Fraglich ist allerdings, ob diese Aktivierung auch in Anwesenheit von HEXIM1 erfolgt. Falls die Acetylierung von CDK9 für die Aktivierung der RNA-Polymerase II ausreichend ist, würde dies zu einer H3K4-Methylierung über den gesamten Bereich des transkribierten Gens zur Folge haben. Das Resultat könnte ein ektopes H3K4-Methylierungsmuster sein, ähnlich wie die durch der11 ausgelöste ektipe H3K79-Methylierung (Krivtsov et al., 2008). Dies würde den normalen Entwicklungsprozess der Zelle stören.

Die Anwesenheit von NFκB1/RelA im der4-Komplex könnte darauf hinweisen, dass das der4-Protein einen Einfluss auf NFκB1-Zielgene hat bzw. in den NFκB1-Signalweg eingreift. Des Weiteren belegen 23 C-terminale Peptide des AF4-Proteins in der der4-Protein-Elution, dass das Wildtyp-AF4-Protein Teil des der4-Komplexes ist. Untersuchungen, ob auch die Interaktionspartner ENL, AF9, AF10 und DOT1L im der4-Komplex nachweisbar sind, waren allerdings negativ. Zudem konnte nur eine schwache DDX6-Interaktion nachgewiesen werden. Somit scheint das AF4-Protein im der4-Komplex eingeschlossen zu sein und es kann keine eigenen Interaktionen zu anderen Proteinen ausbilden. Damit ist es zwar vor dem SIAH1/2-vermittelten Abbau geschützt, aber gleichzeitig wird die Menge an frei verfügbarem AF4 in der Zelle beeinträchtigt; auch dies könnte einen Beitrag zum Erscheinungsbild der t(4;11)-Leukämie leisten.

Abschließend soll festgehalten werden, dass der der4-Komplex partielle Eigenschaften des AF4- und MLL-Wildtyp-Proteins aufweist. Dadurch kommt es zu einer kompetitiven Situation zwischen dem der4-Komplex und dem AF4- und MLL-Komplex. Die Regulation des P-TEFb-Komplexes scheint dabei ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen.

Das der4-Protein scheint in regulatorische Mechanismen einzugreifen, indem es elementare transkriptionelle Prozesse beeinflusst: es werden RNA Polymerase II bindende Eigenschaften mit der Fähigkeit zur ektopen H3K4-Methyltransferaseaktivität kombiniert.

5.3 Der ENL-Komplex

5.3.1 Die Isolierung des ENL-Komplexes

Die Transfektion und Reinigung des ENL-Komplexes über einen C-terminalen Strep-Tag war weitaus weniger kompliziert. Die Transfektionseffizienzen des ENL-Expressionsplasmids waren stets sehr hoch, sodass auch eine sehr große Menge an ENL-Protein in den Elutionsfraktionen nachweisbar war; dies korrelierte aber nicht mit einer erhöhten Identifizierungsrate an Komplexpartnern. In nLC-MALDI-MS/MS-Experimenten konnten keine Peptide von bekannten Interaktionspartnern nachgewiesen werden. Lediglich eine große Anzahl an ENL-Peptiden wurde identifiziert. Vermutlich aufgrund der dominanten Menge an ENL-Peptiden konnten keine Interaktionspartner identifiziert werden. Einige ENL-Peptide zeigten sogar eine so starke Bindung an die nLC-Säule, dass sie trotz mehrmaligen Waschens der Säule nach den ENL-Läufen immer noch in anschließenden Läufen mit anderen Proben nachweisbar waren. Verschiedene Versuche, die ENL-Konzentration zu verringern, beispielsweise durch eine zweite Reinigung über einen zweiten Tag, blieben erfolglos. Auch mittels Western Blot konnten leider nicht sehr viele Interaktionen nachgewiesen werden. Eine plausible Erklärung für diese negativen Resultate gibt es derzeit nicht. Jedoch war die Isolierung dieses Komplexes nicht das Hauptziel der Arbeit, so dass nicht alle Parameter zu Verbesserung der Reinigung und Identifizierung bearbeitet werden konnten.

5.3.2 Identifizierte Interaktionspartner des ENL-Proteins

Die mittels Western Blot identifizierten Interaktionspartner waren AF4, CDK9, CCNT1, RNA-Polymerase II, NFκB1 und RING1. Damit ist auch das ENL mit dem globalen positiven transkriptionellen Elongationsfaktor P-TEFb assoziiert. Es ist aber während dieser Arbeit nicht näher untersucht worden, ob die Regulatoren BRD4 und HEXIM1 am ENL-Komplex beteiligt

sind. Es kann somit noch keine eindeutige Aussage über die Eigenschaft des ENL-Komplexes getroffen werden, auch wenn ENL mit der RNA-Polymerase assoziiert vorliegt. Die Identifizierung von CCNT1 widerspricht der Publikation von Mueller und Kollegen, die explizit darauf hinweisen, dass sie CCNT2 und nicht CCNT1 als ENL-Komplexpартner identifiziert haben (Mueller et al., 2007). Auch die Identifizierung von AF4 im ENL-Komplex war nicht so eindeutig wie bei der angesprochenen Publikation. Es konnte allerdings das Protein RING1 identifiziert werden, wobei der Nachweis von PC3 in dieser Arbeit nicht gelang. Beide Proteine sind wichtige Komponenten des *polycomb repressor complex 1* (PRC1), der für die Aufrechterhaltung eines inaktiven Transkriptionsstatus verantwortlich ist (Satijn et al., 1997). Demzufolge scheint der ENL-Komplex auf den ersten Blick eher reprimierende Eigenschaften zu besitzen. Dagegen spricht allerdings die Anwesenheit von DOT1L, die zu einer H3K79-Methylierung führt und einen offenen Chromatinstatus vermittelt (Steger et al., 2008). Auch der Nachweis von NFκB1 im ENL-Komplex spricht gegen die reprimierenden Eigenschaften, da NFκB1 eigentlich nur dann im Zellkern vorliegt, wenn es seine Zielgene aktiviert (Karin & Ben-Neriah, 2000; Zhong et al., 1997; Wang et al., 2000).

Es sind folglich noch eine Reihe von Untersuchungen nötig, um eine präzise Aussage über die Eigenschaften und Funktionen des ENL-Komplexes machen zu können. Möglich wäre, dass der ENL-Komplex in zwei unterschiedlichen Formen vorliegt, oder aber, dass er vielleicht als Gegenspieler zum aktiven AF4-Komplex fungiert. ENL könnte bevorzugt als reprimierender Komplex vorliegen, und durch eine Assoziation mit AF4 in einen aktiven Komplex übergehen.

5.3.3 Die Interaktion zwischen AF4 und ENL

In dieser Arbeit wurde auch die Interaktion zwischen ENL und AF4 untersucht. ENL ist eines der ersten Proteine, die als Interaktionspartner des AF4-Proteins entdeckt wurden (Zeisig et al., 2005). Bislang ist die genaue Funktion dieser Interaktion aber noch nicht ganz aufgeklärt.

Bitoun und ihre Kollegen konnten in murinen Zellen zeigen, dass das ENL-Protein das AF4 stabilisiert und es vor dem proteasomalen Abbau schützt (Bitoun et al., 2007). Dieses Experiment wurde von uns in 293T-Zellen wiederholt, mit dem Ergebnis, dass in humanen Zellen keine Stabilisierung des AF4-Proteins durch ENL detektiert werden konnte. Die gleichzeitige Anwesenheit von ENL und SIAH führte zu einem deutlichen Abbau von AF4 (siehe Kapitel 4.6). Folglich scheint das ENL-Protein im AF4-Komplex bis jetzt nur die Funktion eines Brückenproteins zu besitzen, indem es AF10 und DOT1L für den AF4-Komplex rekrutiert.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Biochemica, Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen

SUBSTANZEN	BEZUGSQUELLE (FIRMA)
ACN (Acetonitril).....	<i>Roth</i>
Acrylamid.....	<i>Roth</i>
Adenosyl-L-Methionine, S-[methyl- ³ H]-, Specific Activity: 55-85Ci (2.03-3.15TBq)/mMole, 250µCi (9.25MBq).....	<i>Perkin Elmer</i>
Agar.....	<i>Sigma</i>
Agarose.....	<i>Invitrogen</i>
6-Aminocapronsäure.....	<i>Roth</i>
Ampicillin.....	<i>Roth</i>
APOD.....	<i>Roth</i>
Avidin.....	<i>IBA GmbH</i>
Bacto-Pepton.....	<i>Difco</i>
Bacto-Trypton.....	<i>Difco</i>
Biotin.....	<i>Sigma</i>
Bisacrylamid.....	<i>Roth</i>
Brillantblau G-250.....	<i>Sigma</i>
Brillantblau R-250.....	<i>Sigma</i>
Bromphenolblau.....	<i>Roth</i>
BSA.....	<i>Roth</i>
CaCl ₂	<i>Merck</i>
CAPS.....	<i>Sigma</i>
Core histones.....	<i>Upstate</i>
Desthiobiotin.....	<i>IBA GmbH</i>
DMSO.....	<i>Sigma</i>
λ-DNA (für DNA-Marker).....	<i>MBI Fermentas</i>
dNTPs.....	<i>Peqlab</i>
DTT.....	<i>Biomol</i>
EDTA.....	<i>Roth</i>
EN ³ HANCE™ Autoradiography Enhancer, 1L	<i>Perkin Elmer</i>
Essigsäure.....	<i>Riedel De Haen</i>
Ethanol.....	<i>Roth</i>
Ethidiumbromid.....	<i>Sigma</i>
FA (Ameisensäure, engl. <i>formic acid</i>).....	<i>Sigma</i>
Gelatine.....	<i>Merck</i>
[Glu ¹]-Fibrinopeptid B.....	<i>Bachem</i>
Glycerin 86%.....	<i>Roth</i>
Glycin.....	<i>Roth</i>
10x HABA Puffer.....	<i>IBA GmbH</i>
H ₃ BO ₃	<i>Merck</i>
Harnstoff.....	<i>Roth</i>
HEPES.....	<i>Roth</i>
IPTG.....	<i>Saxon</i>
Isopropanol.....	<i>Roth</i>
Kanamycin.....	<i>Roth</i>
Lysozym.....	<i>Sigma</i>

Methanol.....	<i>Sigma</i>
MgCl ₂	<i>Merck</i>
MgSO ₄	<i>Roth</i>
Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE (Prestained).....	<i>New England Biolabs; Biorad</i>
NaAc	<i>Merck</i>
NaCl	<i>Roth</i>
NaF.....	<i>Riedel De Haen</i>
Na ₂ HPO ₄	<i>Merck</i>
NaH ₂ PO ₄	<i>Merck</i>
Na ₃ VO ₄	<i>Sigma</i>
NH ₄ HCO ₃	<i>Fluka</i>
(NH ₄) ₂ SO ₄	<i>Roth</i>
PEI (Polyethylenimin)	<i>Sigma</i>
Phosphatase Inhibitor I + II	<i>Sigma</i>
Phosphorsäure	<i>Riedel De Haen</i>
PMSF.....	<i>Beobringer Mannheim GmbH</i>
Protease Cocktail Set V, EDTA free.....	<i>Calbiochem</i>
Protein G-Agarose.....	<i>Sigma</i>
Protein-G-Sepharose 4 Fast Flow	<i>GE Healthcare</i>
Rnase	<i>Sigma</i>
Roentogen-Rapid-Entwickler.....	<i>Tetenal</i>
Roentogen-Superfix-Fixierlösung.....	<i>Tetenal</i>
Saccharose	<i>Roth</i>
SDS.....	<i>Biomol</i>
TCA (Trichloressigsäure)	<i>Roth</i>
TEMED (N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin).....	<i>Sigma</i>
Tetracyclin	<i>Sigma</i>
TFA (Trifluoressigsäure, engl. <i>trifluoroacetic acid</i>)	<i>Sigma</i>
Tris.....	<i>Roth</i>
Triton-X100	<i>Sigma</i>
Trockenmilch (non-fat)	<i>USA (TOPS)</i>
Trypton	<i>Oxoid</i>
Tween 20	<i>Sigma</i>
X-Gal.....	<i>Roth</i>
Xylen-Cyanol-FF.....	<i>Merck</i>
Yeast Extract.....	<i>Oxoid</i>

ENZYME	BEZUGSQUELLE (FIRMA)
---------------	-----------------------------

alkalische Phosphatase.....	<i>New England Biolabs</i>
DNase	<i>Qiagen</i>
Polymerasen (+ Puffer).....	<i>Promega, 5Prime</i>
Proteinase K.....	<i>Roche</i>
Restriktionsendonukleasen (+ Puffer).....	<i>New England Biolabs</i>
RNase.....	<i>Sigma</i>
Superscript II + III™ Reverse Transkriptase.....	<i>Invitrogen</i>
T4-DNA-Ligase (+ Puffer)	<i>New England Biolabs</i>
T4-DNA-QuickLigase (+ Puffer).....	<i>New England Biolabs</i>
T4-Polynukleotid-Kinase (+ Puffer).....	<i>New England Biolabs</i>
Trypsin, Proteomics Grade, Schweinepankreas	<i>Sigma</i>

MATRICES FÜR MALDI	BEZUGSQUELLE (FIRMA)
α -Cyano-4-Hydroxymzimtsäure (α -CHCA)	<i>Bruker Daltonics</i>
DHB (2,5-Dihydroxybenzoesäure)	<i>Bruker Daltonics</i>

NÄHRMEDIEN + ZUSATZSTOFFE	BEZUGSQUELLE (FIRMA)
DMEM.....	<i>PAA</i>
Foetal Bovine Serum Gold (FBS).....	<i>PAA</i>
L-Glutamin (200 mM)	<i>Biochrom AG</i>
MG 132.....	<i>Calbiochem</i>
PBS	<i>PAA</i>
PEI (Polyethylenimin)	<i>Sigma</i>
Penicillin/Streptomycin (100x)	<i>PAA</i>
Trypan Blue Solution.....	<i>Sigma</i>
Trypsin-EDTA solution 10x	<i>Biochrom AG</i>

GERÄTE	BEZUGSQUELLE (FIRMA)
4800 TOF/TOF™ Analyser	<i>Applied Biosystems/ MDS SCIEX</i>
Abi Prism 310 Genetic Analyzer	<i>PE Applied Biosystems</i>
Agarosegel-Elektrophoresekammer	<i>Owl Separation System</i>
Agilent Technologies 1100 series HPLC system.....	<i>Agilent Technologies</i>
Agilent Zorbax™ 300 SB C18, 75 μ m x 3 mm (Vorsäule)	<i>Agilent Technologies</i>
Akku Jet	<i>Braun</i>
ÄKTA™ FPLC™	<i>GE Healthcare</i>
Blotting-Apparatur für Western Blots	<i>Fröbel</i>
Centrivac	<i>Hereaus Instruments</i>
EASY nLC	<i>Proxeon Biosystems</i>
EASY Spotter	<i>Proxeon Biosystems</i>
ELISA ReaderMR 500	<i>Dynatech</i>
Geltrockner	<i>Fröbel</i>
Gene Quant RNA/DNA-Messgerät	<i>GE Healthcare</i>
LC packings Dionex Pepmap™ 100 column, 75 μ m x 150 mm, C18 3.5, 100 Å.....	<i>Dionex</i>
Mikroskop	<i>Nikon</i>
Netzgerät/PS500XT DC Power Supply.....	<i>Hofer Scientific Instruments</i>
Neubauer-Zählkammer	<i>Brand</i>
PCR-Geräte	<i>PE Applied Biosystems</i>
pH-Meter	<i>Inolab</i>
Rotationsschüttler/ KS 250 basic.....	<i>KIKA Labortechnik</i>
Rotator	<i>Stuart</i>
SDS-PAGE Maxigelapparatur	<i>Biometra</i>
SDS-PAGE Minigelapparatur.....	<i>Biometra</i>
Speed Vac Concentrator	<i>Heræus</i>

Spektralphotometer Hitachi U 2000	<i>Colora</i>
SterilGARD Hood	<i>the Baker Company, inc.</i>
SterilGARD Hood (LaminAir HB2427)	<i>Heraeus</i>
Thermoschüttler	<i>Eppendorf</i>
Tischzentrifuge 5414C.....	<i>Eppendorf</i>
Tischzentrifuge 5702	<i>Eppendorf</i>
Ultraschallgerät Digital Sonifier W-250 D	<i>Branson</i>
UV-Schirm (TFX-20M).....	<i>Life Technologies</i>
Verdauroboter Microlab Star	<i>Hamilton</i>
Votrex-2 Genie.....	<i>Scientific Industries</i>
Wasserbäder	<i>Julabo</i>
Zell-Inkubatoren	<i>Heraeus</i>
Zentrifuge J2-HS.....	<i>Beckmann</i>
Zentrifuge J6-HC	<i>Beckmann</i>

SONSTIGES MATERIAL

BEZUGSQUELLE (FIRMA)

3MM Chromatographiepapier.....	<i>Whatman</i>
500 cm ² Square Cell Culture Dishes (Zellplatten)	<i>Corining Incorporated</i>
96 well Platten.....	<i>Greiner</i>
ANTI-FLAG [®] M2 Agarose Affinity Gel.....	<i>Sigma</i>
BCA Protein Assay Kit	<i>Pierce</i>
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit.....	<i>Perkin Elmer</i>
CELLSTAR [®] Gewebekulturschalen (Ø 15 cm)	<i>Greiner bio-one</i>
ECL Western Blotting Analysis System	<i>GE Healthcare</i>
FLAG [®] Peptide	<i>Sigma</i>
Gel Filtration HMW Calibration Kit	<i>GE Healthcare</i>
Hybond [™] -P.....	<i>Ge Healthcare</i>
Micro Bio-Spin [®] Chromatographiesäulen.....	<i>Bio Rad</i>
Mikrozentrifugengefäße/ Caps	<i>Eppendorf</i>
mRNA Isolation Kit	<i>Roche</i>
PCR Gefäße	<i>Greiner bio-one</i>
Propylensäulen 5 ml.....	<i>Qiagen</i>
Pur Yield Plasmid Purification System	<i>Promega</i>
Qiagen DNeasy Tissue Kit.....	<i>Qiagen</i>
Qiagen Gel Extraction Kit.....	<i>Qiagen</i>
Qiagen Oligotex mRNA Mini Kit.....	<i>Qiagen</i>
Qiagen PCR Purification Kit.....	<i>Qiagen</i>
Qiagen RNeasy Mini Kit.....	<i>Qiagen</i>
Qiagen Spin Plasmid Kit.....	<i>Qiagen</i>
Röntgenfilme.....	<i>Fujifilm</i>
Scheidetrichter	<i>Schott</i>
Sequenziergefäße	<i>PE Applied Biosystems</i>
Sterile Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml).....	<i>Greiner bio-one</i>
Sterile Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 100 µl).....	<i>Greiner bio-one</i>
Strep-Tactin [®] Superflow [®] Säulen	<i>IBA GmbH</i>
Strep-Tactin [®] Superflow [®] , 50% Suspension.....	<i>IBA GmbH</i>
Superose 6 10/300 GL column	<i>GE Healthcare</i>
Vivaspin 500, Zentrifugalfiltereinheiten	<i>Sartorius Stedim Biotech</i>
Zellkulturschalen 10 cm	<i>Sarstedt</i>

6.1.2 Pufferlösungen und Medien

PUFFER	ZUSAMMENSETZUNG	
Antikörperaufreinigung		
10x Bindepuffer	0,2 M	NaH ₂ PO ₄ pH 7,0
Elutionspuffer AK	0,1 M	Glycin pH 2,5
Neutralisationspuffer	1 M	Tris/ HCl pH 9,0
SDS-PAGE		
2x Lämmli-puffer	10 mM 200 mM 4% 20% 0.2%	Tris/HCl (pH 6,8) DTT SDS Glycerin Bromphenolblau
Trenngelpuffer pH 8,8	1 M	Tris mit HCl auf pH 8,8 einstellen
Sammelgelpuffer pH 6,8	1 M	Tris mit HCl auf pH 6,8 einstellen
Elektrodenpuffer	3,03 g 14,4 g 1,0 g ad 1000 ml	Tris Glycin SDS Wasser
Coomassie Blau-Färbung (Standard)		
Färbelösung	0,8 g 100 ml 40 ml ad 500 ml	Brillantblau R-250 Isopropanol Essigsäure Wasser
Entfärbelösung	100 ml 100 ml ad 1000 ml	Essigsäure Methanol Wasser
Kolloidale Coomassie Färbung nach Neuhoff		
Stammlösung I	3-4 g 250 ml 75 g 100 ml 200 ml	Brillantblau G-250 7,5% ige Essigsäure Ammoniumsulfat Methanol Aceton

Stammlösung II.....	100 g 20 g ad 800 ml	<i>Ammoniumsulfat</i> <i>konzentrierte Phosphorsäure</i> <i>Wasser</i>
Fixierlösung.....	12 g ad 100 ml	<i>TCA</i> <i>Wasser</i>
Neutralisierungslösung.....	6 g ad 500 ml	<i>Tris</i> <i>Wasser</i> <i>mit H₃PO₄ auf pH 6,5 einstellen</i>
Waschlösung.....	25% ad 500 ml	<i>Methanol</i> <i>Wasser</i>
Stabilisierungslösung.....	20% ad 500 ml	<i>Ammoniumsulfat</i> <i>Wasser</i>

Western Blot

CAPS-Puffer.....	10 mM 0,1% 0,01%	<i>CAPS pH 11</i> <i>Methanol</i> <i>SDS</i>
Anoden-Puffer I pH 10,4.....	300 mM 20%	<i>Tris</i> <i>Methanol</i>
Anodenpuffer II pH 10,4.....	25 mM 20%	<i>Tris</i> <i>Methanol</i>
Kathodenpuffer pH 9,4.....	25 mM 40 mM 20%	<i>Tris</i> <i>6-Aminocapronsäure</i> <i>Methanol</i>
TBS-T 0,1%.....	10 mM 150 mM 0,1%	<i>Tris/HCl (pH 7.5)</i> <i>NaCl</i> <i>Tween 20</i>

Aufreinigungen mittels Tag

Lysispuffer pH 7,5.....	150 mM 20 mM 1% 0,4 mM	<i>NaCl</i> <i>HEPES</i> <i>TritonX-100</i> <i>EDTA</i>
frisch zugegeben:	1 mM 10 mM 1 mM 1x	<i>Na₃VO₄</i> <i>NaF</i> <i>PMSF</i> <i>Protease Inhibitor cocktail Set V, EDTA free</i> <i>(100x Stock solution, Calbiochem)</i>

Strep-Tag

Waschpuffer pH 8,0.....	100 mM 150 mM 1 mM	<i>Tris/ HCl</i> <i>NaCl</i> <i>EDTA</i>
-------------------------	--------------------------	--

Elutionspuffer 1 (2 mM Biotin) pH 8,0	100 mM	Tris/ HCl
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	2 mM	Biotin
Elutionspuffer 2 (Desthiobiotin) pH 8,0	100 mM	Tris/ HCl
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	5 mM	Desthiobiotin
Elutionspuffer 3 (10 mM Biotin) pH 8,0	100 mM	Tris/ HCl
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	10 mM	Biotin
Regenerierungspuffer (HABA-Puffer) pH 8,0	100 mM	Tris/ HCl
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 mM	HABA (Hydroxy-azobenzyl-benzoesäure)

Flag-Tag

Flag-Wasch-Puffer	50 mM	Tris
	150 mM	NaCl
	0,2%	TritonX-100
		mit HCl auf pH 7,4 einstellen
TBS-Puffer	50 mM	Tris
	150 mM	NaCl
		mit HCl auf pH 7,4 einstellen
Flag-Elutionspuffer	200 µg/ ml	Flag-Peptid in TBS-Puffer

HIS-Tag

HIS-Lysispuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	10 mM	Imidazol
		pH auf 8,0 mit NaOH einstellen
frisch zugegeben:	1 mM	Na ₃ VO ₄
	10 mM	NaF
	1 mM	PMSF
	1x	Protease Inhibitor cocktail Set V, EDTA free (100x Stock solution, Calbiochem)
HIS-Waschpuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	20 mM	Imidazol
		pH auf 8,0 mit NaOH einstellen
HIS-Elutionspuffer	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	300 mM	NaCl
	250 mM	Imidazol
		pH auf 8,0 mit NaOH einstellen

Tryptischer In-Lösung Verdau

Probenpuffer.....	10 mg 25 mM	Harnstoff NH ₄ HCO ₃
DTT-Lösung.....	6 mg 25 mM	DTT NH ₄ HCO ₃
IAA-Lösung.....	20 mg 25 mM	IAA NH ₄ HCO ₃

Molekularbiologische Standardmethoden

lowTE.....	10 mM 0.1 mM	Tris/HCl (pH 8,0) EDTA
E-Gel-Puffer (pH 7.9).....	40 mM 2 mM 0.5 mM	Tris EDTA NaAc
TBE-Puffer.....	100 mM 500 mM 2.5 mM	Tris H ₃ BO ₃ EDTA
ST-Puffer.....	80% 5% 50 mM 50 mM	Saccharose Triton X-100 EDTA Tris/ HCl (pH 8,0)
CaCl ₂ -Transformationspuffer.....	10 mM 10 mM 10 mM	Tris CaCl ₂ MgCl ₂
DNA-Ladepuffer.....	50% 100 mM 0,1% 0,1%	Saccharose EDTA Bromphenolblau Xylen-Cyanol-FF
RSB.....	10 mM 1 mM 3 mM	Tris/HCl (pH 7.4) NaCl Magnesiumchlorid

E. coli.-MEDIEN

ZUSAMMENSETZUNG

S.O.C.-Medium.....	2% 0.5% 10 mM 2.5 mM 10 mM 10 mM 20 mM	Bacto-Tryptone Yeast Extract NaCl KCl MgCl ₂ MgSO ₄ Glucose
--------------------	--	---

YT-Medium	1%	<i>Bacto Tryptone</i>
	0.5%	<i>Yeast Extract</i>
	0.5%	<i>NaCl</i>
SOB-Medium	2% (w/v)	<i>Bacto-Tryptone</i>
	0.5% (w/v)	<i>Yeast Extract</i>
Salzlösung (E-Transformation)	1 M	<i>NaCl</i>
	100 mM	<i>MgCl₂</i>
	100 mM	<i>MgSO₄</i>
YT-Agar	1.2%	<i>Agar</i>
YT _{amp} -Medium	+ 100 µg/ml	<i>Ampicillin</i>
YT _{kan} -Medium	+ 25 µg/ml	<i>Kanamycin</i>

6.1.3 Synthetische Oligonukleotide

Die für Klonierungen, PCR-Analysen und Sequenzierungen verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Biospring und Operon synthetisiert.

6.1.3.1 Oligonukleotide für Sequenzierungen

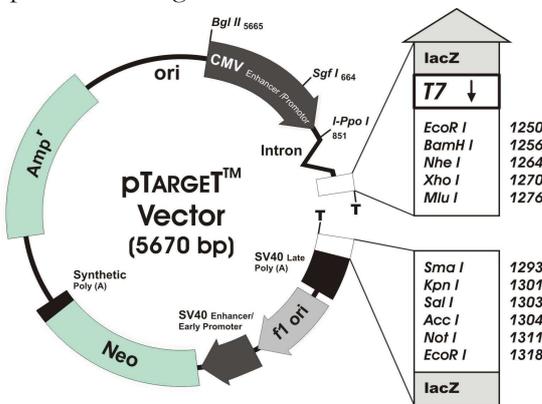
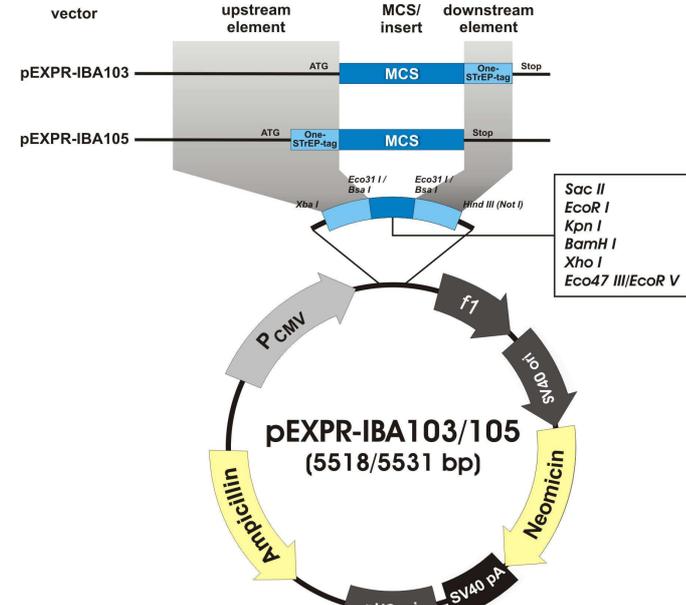
NAME (DATENBANKBEZEICHNUNG)	SEQUENZ
pTarget•32	5' - GCGATTAAGTTGAGTTACGC - 3'
pTarget•52	5' - GGAATTGTGAGCGGATAACA - 3'
pTarget•Cla•5	5' - CGCCGCGCTTAATGCGCCGC - 3'
CDK9•31	5' - CAGATCACCCAGCAGTCCACC - 3'
CDK9•51	5' - GAACAGCTCCCCGAAGGTGCC - 3'
CyclinT1•31	5' - GGAATCTCCTCGAGATCTGGC - 3'
CyclinT1•33	5' - GCACAGACTTCTTACTTCATGG - 3'
CyclinT1•34	5' - CCTACTCAGGGTCATCGGACTAGT - 3'
CyclinT1•51	5' - GTCCACGCCAAAACGACGGGA - 3'
IBAder11•FW	5' - CAGTATCTGCTCCCTGCTTGTG - 3'
IBAder11•RW	5' - GGTGGTCCCGGGTCGGCGGGGAAG - 3'
IBA•3	5' - GAGAACCCTACTGCTTACTGGC - 3'
IBA•5	5' - TAGAAGGCACAGTCGAGG - 3'

6.1.3.2 Oligonukleotide für Klonierungen

NAME (DATENBANKBEZEICHNUNG)	SEQUENZ
der4 in IBA103/105	
Sfi/Cla-Linker•FW	5' - CGGAATTCGGCCTCACTGGCCAAGCTTATCGATGGATCCCG - 3'
Sfi/Cla-Linker•RW	5' - CGGGATCCATCGATAAGCTTGGCCAGTGAGGCCGAATTCGG - 3'
der4-Sbf1•FW	5' - CAACCTGCAGGGCAAGTCGCTGTTCTTCCGGAAGT - 3'
der4-Cla1•RW	5' - CCATCGATGTTTAGGAACTTCCGGCATTCTTG - 3'
SacII/SfiI-Linker•FW	5' - GGCCGCGGTCCCATTTCGGCCTCACTGGCCGG - 3'
SacII/SfiI-Linker•FW	5' - CCGGCCAGTGAGGCCGAATGGGACCGCGGCC - 3'
der11 in IBA103/105	
Sfi/Hpa-Linker•FW	5' - GGAATTCGGCCTCACTGGCCAAGCTTGTTAACGGATCCCG - 3'
Sfi/Hpa-Linker•RW	5' - CGGGATCCGTTAACAAGCTTGGCCAGTGAGGCCGAATTCGG - 3'
der11-AleI•FW	5' - CCGCACAAATGTGTGCACCTTGGCCCT - 3'
der11-HpaI•RW	5' - CCGGTTAACAGGTGTTTTGGTTAATTCTTGTAGC - 3'
HSP70b•FW	5' - CGTCGCGAGCCCGTGCTCGCCTCAGGGA - 3'
HSP70b•RW	5' - CGGGCCAGTGAGGCCAAGCTTCTTGTCTGGATGC - 3'
ENL in IBA103/105	
IBA103-EcoRV•FW	5' - GCGAATTCGAGCTCGATATCCGGGGATCCCTCGAGCG - 3'
IBA103-EcoRV•RW	5' - CGCTCGAGGGATCCCCGGATATCGAGCTCGAATTCGC - 3'
ENL-XhoI-SbfI•3	5' - GCCTCGAGATGGACAATCAGTGCACCGTCCAG - 3'
ENL-XhoI-SbfI•5	5' - GCCCTGCAGGGCTGTGGCCACGGCCTCCAGGCAGC - 3'
FelC in IBA103/105	
FelC-XhoI-SbfI•3	5' - GCCTCGAGATGGCAGCCCAGTCAAGTTTTGTAC - 3'
FelC-XhoI-SbfI•5	5' - GCCCTGCAGGGCAAGCCAAAAAGAATTCCTCC - 3'
zusätzl. Flag-Tag in IBA103	
Flag-MLL•3	5' - TGGCCATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGGCCTCAC - 3'
Flag-MLL•5	5' - AGGCCCTTGTCGTTCATCGTCTTTGTAGTCCATGGCCAGTG - 3'
Flag-XbaI-Acc65I•3	5' - GGTCTAGAATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGGGTACCGG - 3'
Flag-XbaI-Acc65I•5	5' - GGGGTACCCTTGTCGTTCATCGTCTTTGTAGTCCATTCTAGAGG - 3'
pTEFb in pTARGET	
CDK9•32	5' - CGGATATCATGGCAAAGCAGTACGACTCG - 3'
CDK9•52	5' - CGGATATCTCAGAAGACGCGCTCAAACCTC - 3'
CyclinT1•32	5' - CGGATATCATGGAGGGAGAGAGGAAGAAC - 3'
CyclinT1•52	5' - CGGATATCTTACTTAGGAAGGGGTGGAAGTG - 3'

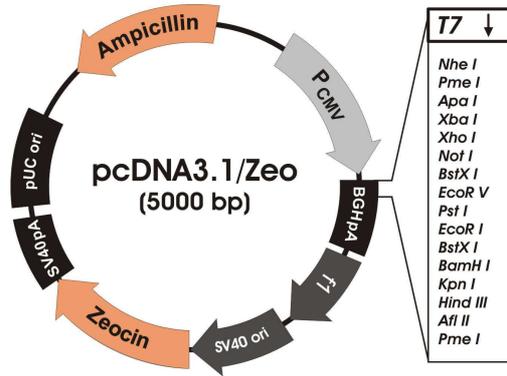
Die Kultivierung der Säugerzelllinie erfolgte bei 5% CO₂, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 37 °C. Das verwendete Nährmedium wurde mit 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, sowie 2 mM L-Glutamin supplementiert.

6.1.5 Vektoren und Plasmide

Name (Hersteller)	Charakteristik und Beschreibung
<p>pTARGET™ (Promega)</p>	<p>Eukaryontischer Expressionsvektor, der für die transiente als auch stabile Expression verwendet werden kann. Er besitzt die Enhancer/Promotorregion des humanen Cytomegalovirus (CMV), welche eine konstitutive Expression ermöglicht.</p> 
<p>pEXPR-IBA-103/105 (IBA GmbH)</p>	<p>Eukaryontischer Expressionsvektor-System, der für die transiente als auch stabile Expression verwendet werden kann und einen CMV-Promotor besitzt. Außerdem ist ein Strep-Tactin-Affinitätstag zur spezifischen Isolierung des rekombinanten Proteins eingebaut. Das Strep-Tag befindet sich beim pEXPR-IBA103 am C-Terminus des rekombinanten Proteins, für den pEXPR-IBA105 hingegen am N-Terminus.</p> 

**pcDNA3.1/Zeo(-)
(Promega)**

Der pcDNA3.1/Zeo(-) ist gleichermaßen mit einem CMV-Promotor ausgestattet und für die transiente bzw. stabile Expression in Säugerzellen geeignet.



6.1.6 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper.....

Name	Organismus	Verdünnung	Beschreibung / Hersteller
AF4-Komplex			
anti-AF4•N	Maus	1:500	Gereinigter monoklonaler Antikörper gegen den N-Terminus des humanen AF4 Proteins; Hybridomaklon 6E9/5 (AK Marschalek)
anti-AF4•C	Kaninchen	1:500	Polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus von AF4 (abcam)
anti-AF9	Kaninchen	1:100	Polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus von menschlichem AF9 (Abgent)
anti-AF10	Kaninchen	1:100	Polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus von menschlichem AF10 (Abgent)
anti-Brd4	Kaninchen	1:1000	Polyklonaler Antikörper, der gegen die Aminosäuren 1347 - 1362 von menschlichem Brd4 gerichtet ist (abcam)
anti-Brd4•H250	Kaninchen	1:200	Polyklonaler Antikörper, der gegen die Aminosäuren 1031-1280 von menschlichem Brd4 gerichtet ist (Santa Cruz Biotechnology)
anti-Brd4•K14	Ziege	1:200	Polyklonaler Antikörper gegen den N-Terminus von menschlichem Brd4 (Santa Cruz Biotechnology)
anti-Brd4•N17	Ziege	1:200	Polyklonaler Antikörper gegen den N-Terminus von menschlichem Brd4 (Santa Cruz Biotechnology)
anti-CDK9	Kaninchen	1:500	Polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus von menschlichem CDK9 (Santa Cruz Biotechnology)

anti-Cyclin T1	Kaninchen	1:500	<i>Polyklonaler Antikörper, der gegen die Aminosäuren 261-505 von menschlichem Cyclin T1 gerichtet ist (Santa Cruz Biotechnology)</i>
anti-Cyclin T2	Maus	1:100	<i>Monoklonaler Antikörper gegen den C-Terminus von menschlichem Cyclin T2 (abcam)</i>
anti-Dot1L	Kaninchen	1:100	<i>Polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus von menschlichem Dot1L (Abgent)</i>
anti-ENL	Kaninchen	1:100	<i>Polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus von menschlichem ENL (Abgent)</i>
anti-HEXIM1	Kaninchen	1:400	<i>Polyklonaler Antikörper, der ab Aminosäuren 300 bis zum C-Terminus des menschlichen HEXIM1 gerichtet ist (Abgent)</i>
anti-NFκB	Kaninchen	1:400	<i>Polyklonaler Antikörper der gegen die C-terminalen Aminosäuren 532-551 von NFκB p65 gerichtet ist (abcam)</i>
anti-NPM	Maus	1:250	<i>Monoklonaler Antikörper der gegen die letzten 68 C-terminalen Aminosäuren von NPM gerichtet ist (abcam)</i>
anti-PC3	Kaninchen	1:100	<i>Polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus von menschlichem CBX8 (Abgent)</i>
anti-Ring1	Kaninchen	1:200	<i>Polyklonaler Antikörper gegen den N-Terminus von menschlichem Ring1, Isoform 1 (abcam)</i>
anti-RNA-Polymerase II-CTD [4H8]	Maus	1:5000	<i>Monoklonaler Antikörper der phosphorylierte und nicht-phosphorylierte RNA Polymerase II erkennt (abcam)</i>
anti-Siah-1	Ziege	1:1000	<i>Polyklonaler Antikörper gegen den N-Terminus von menschlichem Siah-1 (Santa Cruz Biotechnology)</i>
MLL-Komplex			
anti-Ash2L	Maus	1:100	<i>Monoklonaler Antikörper gegen Ash2L (abcam)</i>
anti-CBP	Maus	1:50	<i>Monoklonaler Antikörper gegen rekombinantes CBP (abcam)</i>
anti-CYP33	Maus	1:1000	<i>Monoklonaler Antikörper gegen CYP33 (abcam)</i>
anti-E2F4	Maus	1:100	<i>Monoklonaler Antikörper gegen das komplette Protein (abcam)</i>
anti-E2F6	Maus	1:1000	<i>Monoklonaler Antikörper gegen das komplette Protein (abcam)</i>
anti-Gadd34	Ziege	1:500	<i>Polyklonaler Antikörper der gegen die Aminosäuren 664-674 (C-Terminus) von menschlichem Gadd34 gerichtet ist (abcam)</i>
anti-HCF1	Ziege	1:500	<i>Polyklonaler Antikörper gegen den N-Terminus von menschlichem HCF1 (Santa Cruz Biotechnology)</i>
anti-HCF2	Maus	1:100	<i>Monoklonaler Antikörper gegen ein menschliches rekombinantes Peptid von HCF2 (abcam)</i>

anti-HIP2	Kaninchen	1:10000	<i>Monoklonaler Antikörper gegen menschliches HIP2 (abcam)</i>
anti-MLL•27(1)	Maus	1:100	<i>Gereinigter monoklonaler Antikörper gegen den mittleren Teil des humanen MLL Proteins, aber noch vor der Taspase-Schnittstelle, Hybridoma-Klon 5E1 (AK Marschalek)</i>
anti-MLL1	Kaninchen	1:1000	<i>Polyklonaler Antikörper gegen den N-Terminus des menschlichen MLL (Bethyl Laboratories)</i>
anti-MOF	Ziege	1:500	<i>Polyklonaler Antikörper gegen den N-Terminus von menschlichem MOF (Santa Cruz Biotechnology)</i>
anti-N-Cor (C-20)	Ziege	1:500	<i>Polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus von murinem N-Cor (Santa Cruz Biotechnology)</i>
anti-RbBP5	Kaninchen	1:1000	<i>Polyklonaler Antikörper, der gegen die C-terminalen Aminosäuren 500-538 von RbBP5 gerichtet ist (abcam)</i>
anti-RFC1	Ziege	1:2000	<i>Polyklonaler Antikörper gegen menschliches RFC1 (abcam)</i>
anti-Ring2	Kaninchen	1:600	<i>Polyklonaler Antikörper der gegen die Aminosäuren 156-204 von menschlichem Ring2 gerichtet ist (abcam)</i>
anti-SmarcB1	Kaninchen	1:1000	<i>Polyklonaler Antikörper gegen menschliches SmarCB1 (abcam)</i>
anti-WDR5	Kaninchen	1:200	<i>Polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus von menschlichem WDR5 (abcam)</i>
Modifikationen			
anti-acetyl-Lysin	Kaninchen	1:1000	<i>Polyklonaler Antikörper gegen acetylierte Lysine (abcam)</i>
anti-PanSUMO	Kaninchen	1:500	<i>Polyklonaler Antikörper gegen alle Isoformen des humanen SUMO Proteins (Abgent)</i>
anti-pTyr	Maus	1:2000	<i>Monoklonaler Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosine (Upstate)</i>
anti-Ubiquitin	Maus	1:2000	<i>Monoklonaler Antikörper gegen das komplette Protein (Santa Cruz Biotechnology)</i>
Tags			
anti-Flag	Maus	1:1000	<i>Monoklonaler Antikörper gegen das Flag-Peptid (DYKDDDDK), (Sigma)</i>
anti-GFP	Maus	1:200	<i>Monoklonaler Antikörper gegen das komplette Protein (Green Fluorescent Protein) aus <i>Aequorea victoria</i> (Santa Cruz Biotechnology)</i>
anti-HA	Maus	1:2000	<i>Monoklonaler Antikörper gegen die Aminosäuren 98-106 (YPYDVPDYA) des Hemagglutinin-Epitops des humanen Influenza Virus (Sigma)</i>
anti-Myc	Kaninchen	1:1000	<i>Monoklonaler Antikörper gegen das c-Myc Epitop (EQKLISEEDL), (Cell Signaling)</i>

anti-Strep	Maus	1:400	<i>Monoklonaler Antikörper, der bereits mit der Meerrettichperoxidase gekoppelt ist und gegen das Strep-Tag gerichtet ist (WSHPQFEKGGGSGGGSGGGWSHPQFEK), (IBA GmbH)</i>
-------------------	------	-------	---

Sekundäre Antikörper.....

Name	Verdünnung	Beschreibung / Hersteller
anti-Mouse	1:10000	<i>anti-Maus Ig (GE Healthcare)</i>
anti-Rabbit	1:10000	<i>anti-Kaninchen Ig (GE Healthcare)</i>
anti-Goat	1:10000	<i>anti-Ziege Ig (Vector Laboratories)</i>

6.2 Standardmethoden der Molekularbiologie

Die nachfolgenden Standardmethoden werden nicht genauer vorgestellt. Sie sind den Protokollsammlungen entnommen (Sambrook et al., 2001).

- Annealing von Oligonukleotiden
- Dephosphorylierung von DNA-5' Enden mit alkalischer Phosphatase (NEB)
- Elektroporation von *E. coli*
- Fällungsmethoden für Nukleinsäuren
- Gelelektrophoresen (DNA, und Protein)
- Gelextraktion und Reinigung von DNA (Qiagen)
- Isolierung von Gesamt-RNA mit Trizol (Invitrogen) und RNeasy Mini Kit (Qiagen)
- Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Promega)
- Ligations-Reaktionen (NEB)
- Minilysat Präparation von Plasmid-DNA nach der ST-Präparationsmethode
- PCR Analysen
- Phosphorylierung von DNA mittels Polynukleotidkinase (NEB)
- Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
- Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen (BCA)
- Protein-Induktionskinetik in *E. coli*
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen (NEB)
- Transformation von *E. coli* mit CaCl_2

Sequenzanalysen

DNA-Sequenzierungen wurden mit dem *ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten, entsprechend der Hersteller-Anleitung, nach der Kettenabbruchmethode. Sie ermöglicht eine auf unterschiedlichen Fluoreszenz-Signalen basierende Sequenzierung von Einzel- oder Doppelstrang-DNA im *ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer*.

6.3 Transfektion der 293T-Zelllinie nach der PEI-Methode

Die Transfektion der 293T Zellen erfolgte unter Verwendung von PEI (Polyethylenimin). Am Vortag der Transfektion wurden ca. $5 \cdot 10^6$ Zellen auf eine Zellkulturschale (\varnothing 15 cm, 25 ml Medium) bzw. ca. $1,75 \cdot 10^7$ Zellen auf eine Zellkulturplatte (500 cm^2 , 100 ml Medium) ausgebracht.

1 bis 2 Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. Die PEI-Transfektionslösung wurde wie folgt angesetzt:

Herstellung von 10 mM PEI (Monomer)

45 mg PEI werden in 8 ml VE-Wasser gelöst, anschließend mit HCl auf pH 6,5 eingestellt und auf 10 ml aufgefüllt. Danach wird die Lösung steril filtriert ($0,2 \mu\text{m}$). Diese Lösung entspricht einer 100 mM PEI-(Monomer) Stammlösung. Für die Transfektion wird die Lösung 1:10 verdünnt, um eine 10 mM Stammlösung zu erhalten.

Transfektionsablauf

Lösung A (PEI:PBS, 1:5)

- Zellkulturschale 50 μl PBS und 90 μl 10 mM PEI-Lösung
- Zellplatte 1605 μl PBS und 321 μl 10 mM PEI-Lösung

Lösung B

- Zellkulturschale 450 μl PBS und 25 μg DNA
- Zellplatte 1605 μl PBS und 80 μg DNA

Unter ständigem Vortexen wurde Lösung B tröpfchenweise in Lösung A gegeben und im Anschluss 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Transfektionsreagenz wurde gleichmäßig auf den Zellen verteilt und die Zellen im Anschluss im Brutschrank 48 Stunden inkubiert.

Zusätzlich erforderten manche Experimente eine Inkubation mit 5 μM des Proteasominhibitors MG132 für 6 - 24 Stunden, bevor die Zellen geerntet und Proteinextrakte hergestellt wurden.

6.4 Methoden zur Proteinreinigung

6.4.1 Spezifische Affinitätschromatographie mit Strep-Tactin

Um die mit dem Strep-Tag versehenen Proteine aus dem pEXPR-IBA-103 Vektor und deren Komplexpartner zu reinigen, gab es zwei verschiedene Ansätze:

- Reinigung über eine Strep-Tactin-Säule (IBA GmbH)
- Reinigung mit einer Strep-Tactin-Suspension (50%, IBA GmbH) in kleinen Chromatographie-Säulen (BioRad)

Die Reinigung über die Strep-Tactin-Säule erwies sich als geeigneter als die Reinigung mittels der Suspension, so dass für die massenspektrometrischen Untersuchungen nur mit den Elutionen der Säulenreinigung gearbeitet wurde. Für Western Blot Analysen wurden die Elutionen aus beiden Methoden verwendet.

Reinigung über eine Strep-Tactin-Säule mit einem Volumen von 0,2 ml

Es wurden ca. $5 \cdot 10^8$ transient transfizierte 293T-Zellen in 5 ml Lysis-Puffer resuspendiert und für 1 Stunde bei 4°C in insgesamt sechs 1,5 ml *Cups* rotiert. Danach wurde das Lysat 30 Minuten bei 4°C mit 14.000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand in neue *Cups* überführt. Zur Blockierung der biotinylierten Proteine, welche an Strep-Tactin-Material irreversibel binden, wurde die Proteinlösung mit je 1 µl Avidin-Lösung (10µg/µl, IBA GmbH) pro Cap für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurde erneut 30 Minuten bei 4°C mit 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Lysispuffer auf ca. 8 ml verdünnt, bevor er auf die Säule gegeben wurde. Die Säule wurde zuvor mit 0,4 ml Waschpuffer equilibriert. Nachdem das gesamte Lysat vollständig 2 Mal durch die Säule gelaufen war, wurde 5 Mal mit 0,2 ml Waschpuffer gewaschen

Es wurden zwei verschiedene Elutionspuffer eingesetzt. Es wurde entweder mit 2 mM Biotin eluiert oder mit 5 mM Desthiobiotin. Desthiobiotin hat den Vorteil, dass es reversibel mit dem Strep-Tag um die Affinitätsmatrix konkurriert und somit das Säulenmaterial mit HABA-Puffer regeneriert werden kann. Dazu wird die Säule dreimal mit dem 5-fachen Säulenvolumen HABA-Puffer behandelt, mit Waschpuffer überschichtet und bei 4°C aufbewahrt. Nachteilig ist jedoch die geringe Ausbeute an gereinigtem Protein bei Verwendung des Desthiobiotin-Puffers. Es wurde 6 Mal mit 0,1 ml Elutionspuffer 1 oder 2 eluiert. Die Elutionseffizienz wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot kontrolliert.

Reinigung mittels Strep-Tactin-Suspension und kleinen Chromatographiesäulen

Es wurden ca. $1,5 \cdot 10^8$ transient transfizierte 293T-Zellen in 0,6 ml Lysis-Puffer resuspendiert und für 1 Stunde bei 4°C rotiert. Danach wurde das Lysat 30 Minuten lang bei 4°C mit 14.000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand in ein neues Cap überführt. Zur Blockierung der biotinylierten Proteine, welche an Strep-Tactin-Material irreversibel binden, wurde die Proteinlösung mit 1 µl Avidin-Lösung (10 µg/µl, IBA GmbH) für 15 min. bei 4°C inkubiert. Danach wurde erneut 30 Minuten bei 4°C mit 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthielt die gewünschten Proteine.

150 µl Strep-Tactin-Suspension wurden in eine kleine Chromatographiesäule (BioRad®) gefüllt und nacheinander mit 500 µl Waschpuffer und 500 µl Lysispuffer equilibriert. Dazu wurde das Säulchen auf ein *Cup* gesteckt und 5 Sekunden bei 0,8 rpm zentrifugiert. Danach wurde das Lysat auf die Säule gegeben und die Säule auf beiden Seiten verschlossen. Das Lysat rotierte 1 Stunde bei Raumtemperatur. Die Beads wurden dann 5 Mal mit 700 µl Waschpuffer gewaschen. Auch bei diesem Schritt wurde jedes Mal das Säulchen auf ein *Cup* gesteckt und 5 Sekunden bei 0,8 rpm zentrifugiert. Das Säulchen wurde von unten verschlossen und die Beads mit 120 µl Elutionspuffer 3 für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um danach die Elution abzuzentrifugieren (0,8 rpm, 20 Sekunden). Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, so dass zwei Elutionen à 120 µl zur Verfügung standen.

Die Elutionseffizienz wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot kontrolliert.

6.4.2 Tandem-Affinitätsreinigung mittels Strep- und Flag-Tag

Um die verschiedenen Komplexe noch besser zu isolieren und den Hintergrund an unspezifischen Proteinen weiter zu minimieren wurden die Konstrukte noch mit einem Flag-Tag am N-Terminus versehen.

Die Komplexe wurden zuerst über das Strep-Tag-System gereinigt und danach folgte die Reinigung über das Flag-Tag-System. Die Isolierung mittels Strep-Tag erfolgte, wie schon beschrieben, entweder über die Strep-Tactin-Säulen oder über die Strep-Tactin-Suspension. Die Strep-Tag-Elutionen wurden dann auf die bereits equilibrierten Flag-Beads gegeben.

Ca. 80 µl Flag-Beads wurden in eine kleine Chromatographiesäule gegeben und zweimal mit TBS-Puffer gewaschen. Danach wurde dreimal mit 0,1 M Glycinlösung pH 3,5 gewaschen um ungebundenen Flag-Antikörper von den Beads zu entfernen. Abschließend wurden die Beads nochmals zweimal mit TBS-Puffer behandelt bevor die Strep-Elution auf die Flag Beads gegeben wurde. Das Ganze wurde dann über Nacht bei 4°C rotiert.

Am nächsten Tag wurde der Durchlauf in einem *Cup* aufgefangen und die Beads einmal mit 500 µl Wasch-Puffer und vier Mal mit 500 µl TBS-Puffer gewaschen (5 Sekunden bei 0,8 rpm zentrifugiert). Eluiert wurde mit 100 µl 2x-Lämmli-Puffer. Die Beads wurden 10 Minuten mit diesem Puffer inkubiert bevor die Elution durch Zentrifugation (20 Sekunden bei 0,8 rpm) gewonnen wurde. Es wurde auch versucht, mit einem Flag-Elutionspuffer die Komplexe von den Beads zu lösen. Dies hat jedoch nicht funktioniert.

Die Elutionseffizienz wurde mittels SDS-PAGE und Western Blot kontrolliert.

6.4.3 Immunopräzipitation

Es wurden ca. $1,5 \cdot 10^8$ transient transfizierte 293T-Zellen in 0,6 ml Lysis-Puffer resuspendiert und für 1 Stunde bei 4°C rotiert. Danach wurde das Lysat 30 Minuten lang bei 4°C mit 14.000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand in ein neues Cap überführt. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren wurden 50 µl Protein G Agarose Beads zum Lysat gegeben und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Beads wurden danach abzentrifugiert und der Überstand in eine leere Chromatographiesäule der Firma BioRad gegeben. Anschließend wurden 5 bis 10 µl des unverdünnten Antikörpers hinzugegeben und zunächst bei Raumtemperatur für eine Stunde rotiert, um dann über Nacht bei 4°C weiterzurotieren. Am nächsten Tag wurden 60 µl Protein G Agarose dazugegeben und nochmals für weitere 3 Stunden bei 4°C rotiert. Danach wurde fünf Mal mit 500 µl TBS-Puffer gewaschen (0,8 rpm für 10 Sekunden zentrifugiert). Für die Elution wurden die Beads mit 100 µl 2x-Lämmli-Puffer für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 0,8 rpm für 20 Sekunden zentrifugiert. Der 2x-Lämmli-Puffer wurde hierfür vorher auf 80°C erwärmt.

6.5 Methoden der Proteinbiochemie

6.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Protokoll für die klassischen SDS-Gele wurde aus der Protokollsammlung von Sambrook et al. (2001) entnommen und wird hier nicht näher vorgestellt.

Für die Herstellung von Gelen mit einem Acrylamidgradienten (T: 7-15%) wurden ein Gradientenmischer (BioRad Laboratories) und eine Schlauchpumpe eingesetzt. Die Gele wurden mit einer Acrylamidlösung (30% Acrylamid, 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid; Rotiphorese® Gel 30 von Roth) hergestellt. Der Zusatz der Bromphenolblaulösung zum 15%-Gelansatz diente lediglich der visuellen Kontrolle der Ausbildung eines homogenen Gradienten. Für eine gute Auftrennung der Proteine im Gel wurden die Gele mit 15 mA pro Gel gestartet und nach einer halben Stunde auf 25 mA pro Gel hochgestellt.

Zusammensetzung für zwei Maxigele (Gradientengele) der Firma Biometra:

Sammelgel (4%)	
Wasser	4,4 ml
Sammelgelpuffer	0,750 ml
AA/BA	0,78 ml
10% SDS	60 µl
<hr/>	
APOD (10%)	30 µl
TEMED	6 µl

Gradientengel		
15%		7%
0,70 ml	Wasser	4,09 ml
4,125 ml	Trenngelpuffer	4,125 ml
5,5 ml	Acrylamid	2,62 ml
110 µl	10% ige SDS-Lösung	110 µl
0,50 ml	Glycerol	-
50 µl	1% ige Bromphenolblaulösung	-
<hr/>		
55 µl	APOD (10%)	55 µl
5,5 µl	TEMED	5,5 µl

6.5.2 Färbemethoden

6.5.2.1 Coomassie Blau-Färbung (Standard)

Die Färbung der Gele erfolgte im direkten Anschluss an die elektrophoretische Trennung. Ohne vorheriges Fixieren der Gele wurden sie für maximal 30 Minuten in der Färbelösung unter leichtem Schütteln angefärbt. Zwecks Reduzierung der Hintergrundfärbung wurden die komplett tiefblau gefärbten Gele anschließend in Entfärbelösung gelegt und weiter geschüttelt. Mehrmaliges Wechseln dieser Lösung war notwendig bis der Hintergrund ausreichend entfärbt und die Banden deutlich sichtbar waren. Die Färbelösung konnte mehrmals verwendet werden. Die Nachweisgrenze liegt bei ungefähr bei 0,1 µg Protein pro Bande.

6.5.2.2 Kolloidale Coomassie Färbung nach Neuhoff

Herstellung der Stammlösungen:

Stammlösung I:

3–4 g Coomassie wurden in 250 ml 7,5% Essigsäure gelöst und auf 60 - 70°C erwärmt. Danach wurde festes Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 30% (g/V) eingerührt. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und der präzipitierte Farbstoff durch Filtration oder Zentrifugation gewonnen. Dieses Präzipitat wurde anschließend in 100 ml warmen Methanol vollständig aufgelöst bevor abschließend 200 ml Aceton dazugegeben wurden.

Stammlösung II:

100 g Ammoniumsulfat wurden in 500 ml Wasser gelöst und unter Rühren langsam 20 g konzentrierte Phosphorsäure zugetropft. Anschließend wurde mit Wasser auf 800 ml aufgefüllt.

Die Färbelösung setzte sich aus 200 ml Stammlösung II, 20 ml Stammlösung I und 30 ml Methanol zusammen. Sie wurde frisch angesetzt und konnte mehrere Male zum Anfärben verwendet werden.

Das Färben:

Vor dem eigentlichen Färbeschritt wurden die Gele für mindestens eine Stunde in der Fixierlösung geschwenkt. Danach wurden die fixierten Gele in die zuvor angesetzte Färbelösung gelegt und über Nacht darin inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Gele zuerst für ein bis drei Minuten in der Neutralisierungslösung geschwenkt, bevor sie für maximal eine Minute mit der

Waschlösung behandelt wurden. Zur kurzen Lagerung wurden die Gele abschließend in die Stabilisierungslösung gelegt.

Die Empfindlichkeit dieser Färbung liegt bei > 30 ng Protein pro Bande bzw. bei 0,7 ng BSA/ mm^2 (Neuhoff et al., 1985; Neuhoff et al., 1988)

6.5.3 Western Blot

Die Antikörper wurden in der Regel in 3% BSA-Lösung mit 0,1% Tween20 in TBS verdünnt. Führte dies zu keinen positiven Ergebnissen, wurde mit 5% Milchpulver mit 0,1% Tween20 in TBS gearbeitet. Diese Lösungen wurden auch zum Blockieren und Verdünnen des Zweitantikörpers verwendet.

6.5.3.1 Proteintransfer

Die Proteine wurden durch die *Semidry*-Technik entweder mit CAPS-Transferpuffer (für Proteine mit einem Molekulargewicht über 200 kDa) oder mit Anoden-Puffer I / II und Kathoden-Puffer aus SDS-Polyacrylamidgelen bei 1 mA/cm^2 für 1-1½ Stunden auf eine Hybond-P PVDF-Membran der Firma GE Healthcare transferiert. Dafür wurde eine *Semidry*-Apparatur der Firma Fröbel verwendet.

6.5.3.2 Hybridisierungsbedingungen

Nach dem Proteintransfer auf die PVDF-Membran wurde diese für eine Stunde bei Raumtemperatur mit der entsprechend zum Antikörper passenden Blockierlösung behandelt. Anschließend wurde mit der Antikörperlösung bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht hybridisiert. Nach dreimaligem 5 min. Waschen mit 0,1% Tween20 in TBS wurde mit dem passenden Zweitantikörper (Verdünnung 1:10000) 1 h bei Raumtemperatur hybridisiert. Nach erneutem dreimaligem fünfminütigen Waschen mit 0,1% Tween20 in TBS wurde der Blot mit dem *ECL Western Blotting Analysis System* der Firma GE Healthcare entwickelt. Ein Röntgenfilm wurde auf dem entwickelten Blot 2 Minuten, 10 Minuten und falls nötig über 2 Stunden exponiert.

6.5.4 Antikörperreinigung

Die Reinigung des α -AF4-N-Antikörpers erfolgte aus Zellüberstand einer Hybridomazelllinie, die in DMEM-Medium mit 10% FCS kultiviert wurde. 300 ml Zellüberstand (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Dr. Ilse Zündorf) lieferten 8-9 ml einer ca. 2 mg/ml konzentrierten Antikörperlösung.

Herstellung der Säule:

2 ml einer 50% igen Protein-G-Sepharose-Lösung wurden in eine leere Propylensäule gefüllt und anschließend mit 5 ml 1x Bindepuffer equilibriert.

Reinigung:

Zu Beginn wurde der Antikörperüberstand 10 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. 270 ml des von Zellbestandteilen befreiten Überstandes wurden im nächsten Schritt mit 30 ml 10x Bindepuffer gemischt. Diese Lösung wurde in einen Scheidetrichter gefüllt und über der selbstgepackten Protein-G-Sepharose-Säule platziert. Die Tropfgeschwindigkeit der Lösung auf die Säule wurde auf ca. 100 ml pro Stunde eingestellt. Ein Aufwirbeln des Säulenmaterials wurde durch Tropfen an den Rand der Säule versucht zu verhindern. Im nächsten Schritt wurde die Säule zehn Mal mit 1 ml 1x Bindepuffer gewaschen. Danach wurde in 15 Elutionsschritten der Antikörper von der Säule gewaschen. Dabei wurden pro Elutionsschritt 500 μ l Elutionspuffer auf die Säule gegeben und jeweils 60 μ l Neutralisationslösung in das Elutionsgefäß vorgelegt. Der gesamte Versuch wurde bei 4 °C durchgeführt.

Der Reinigungsverlauf wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Dabei wurden je 15 μ l der erhaltenen Proben mit 5 μ l 2x Lämmli-Ladepuffer versetzt und über ein 10%-Gel aufgetrennt. Die Quantifizierung des Antikörpers erfolgte mittels Proteinbestimmung mit dem BCA-Kit der Firma Pierce.

Die Proben mit der höchsten Antikörperkonzentration wurden vereint und danach in einen bereits seit mindestens einer Stunde in MilliQ eingelegten Dialyseschlauch gefüllt (10.000 Da Ausschluss, regenerierte Cellulose). Die Antikörperlösung wurde zweimal gegen 500 ml eiskalten PBS-Puffer bei 4 °C dialysiert – einmal eine Stunde, im Anschluss über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung aliquotiert und bei -20 °C weggefroren.

Regenerierung der Säule:

Direkt nach der Reinigung des Antikörpers wurde die Säule mit 10 ml 1x Bindepuffer equilibriert und danach mit einer 0,1% igen Triton-X-100-Lösung bei 37°C für eine Minute inkubiert. Im Anschluss daran wurde mit 5 ml 1x Bindelösung gewaschen bevor die Säule für 12 Stunden mit 70% igem Ethanol inkubiert wurde. Nach erneutem Waschen mit 1x Bindepuffer konnte die Säule dann in 20% igem Ethanol bei 4 °C aufbewahrt zu werden.

6.5.5 Größenausschlusschromatographie

Um eine ungefähre Aussage über die Größe der Komplexe treffen zu können, wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Dabei werden die Proteine aufgrund ihrer Molekülgröße getrennt, wobei große Moleküle zuerst eluieren (inverser Siebeffekt).

500 µl Zelllysat aus ca. $1,5 \cdot 10^8$ transient transfizierten Zellen wurde über eine Superose 6 10/300 GL Säule in 36 Fraktionen á 1 ml aufgetrennt. Das Volumen der Säule betrug 23,56 ml und ein Lauf dauerte ungefähr 2,5 Stunden. Als Laufpuffer wurde 1 mM DTT in PBS-Puffer verwendet.

Die Abschätzung der Komplexgröße erfolgte über ein Chromatogramm einer Standardproteinmischung (*Gel Filtration HMW Calibration Kit, GE Healthcare*). Folgende Größenordnung für die einzelnen Fraktionen wurde ermittelt:

Fraktion	Größe (M _r)	Standardprotein
9	2 000 000	<i>Blue Dextran 2000</i>
13	669 000	<i>Thyroglobulin</i>
15	440 000	<i>Ferritin</i>
17	158 000	<i>Aldolase</i>

Mittels Western Blot wurde die erste Fraktion, die den Proteinkomplex enthielt, bestimmt und zur Bestimmung der Maximalgröße herangezogen.

6.5.6 *In vitro* Histon-Methyltransferase-Assay (HMT)

Mit Hilfe des *in vitro* Histon-Methyltransferase-Assays sollten die gereinigten Komplexe auf ihre Fähigkeit untersucht werden, das Histon H3 zu methylieren. Dieser Versuch wurde mit den AF4- und der4-Elutionen der Säulen-Strep-Reinigungen durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten 293T-Zellen, die mit dem Leervektor pEXPR-IBA103 transfiziert wurden und auf die gleiche Weise gereinigt wurden.

Es wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt: Im ersten Ansatz wurden 5 bzw. 20 µl der Strep-Elutionen mit 5 µl core Histonen (1 µg/µl) der Firma Upstate und mit 2 µCi ³H-SAM (S-(5'-Adenosyl)-L-methionin-(methyl-³H); 55-85 Ci/mMol, Perkin Elmer) für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 2x-Lämmli-Puffer abgestoppt und bei 4°C über Nacht gelagert. Im zweiten Ansatz wurden 15 µl der Strep-Elutionen mit 30 µl eines gereinigten GST-H3-Peptides (Aminosäuren 1 – 46 des humanen Histons H3; freundlicher Weise von Julia Herglotz aus der Arbeitsgruppe von Dr. Lausen am Georg-Speyer-Haus zur Verfügung gestellt) und mit

1 μCi ^3H -SAM für 1,5 h bei 37°C inkubiert. Diese Reaktion wurde anschließend mit 5 μl eines 4x Ladepuffers (500mM Tris-HCl (pH 6,8); 4% SDS, 30% Glycerol, 40mM DTT, Bromphenolblau) abgestoppt und auch über Nacht bei 4°C gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Proben über 15% ige SDS-Mini-Gele aufgetrennt, wobei zunächst nur eine Spannung von 80V angelegt wurde, die – nachdem die Proben das Trenngel erreichten – auf 120 V erhöht wurde. Zusätzlich zu den Proben wurden pro Gel noch eine Spur Größenstandard und eine Spur unbehandelte gereinigte Nukleosomen aufgetragen. Diese beiden Spuren wurden später von dem Gel abgeschnitten und mit Coomassie-Lösung gefärbt. Sie dienten als Laufhöhenreferenz der einzelnen Histone. Die Gele mit den Proben wurden dann für mindestens 30 min. in eine Fixierlösung aus 10% Essigsäure und 10% Glycerol gelegt und anschließend für weitere 30 min. in einer Enhancer-Lösung der Firma Perkin Elmer inkubiert. Danach wurde drei Mal für 10 min. mit Wasser gewaschen bevor die Gele auf einem Gelrockner für 1-1,5 Stunden getrocknet wurden. Die getrockneten Gele wurden in eine Röntgenkassette geklebt und ein Röntgenfilm für ungefähr 1 bis 4 Wochen aufgelegt bevor er entwickelt werden konnte. Die Röntgenkassette mit dem Film wurde dabei bei -80°C gelagert.

6.6 Massenspektrometrie

6.6.1 Tryptischer In-Gel-Verdau der Proteine

Der In-Gel-Verdau der ausgeschnittenen Proteinspots erfolgte mit der in der Proteomanalytik am häufigsten eingesetzten Protease Trypsin. Dabei werden die Proteine C-terminal von den Aminosäuren Arginin und Lysin geschnitten, sofern diesen kein Prolin folgt. Die Proteinverdau wurden sowohl manuell in 1,5 ml Eppendorfcups, als auch automatisch mit Hilfe eines Pipettierroboters in 96-well Platten durchgeführt. Unterschiede im Verdauprotokoll ergaben sich nur bei den eingesetzten Volumina. Bei einem Proteinverdau mit Hilfe des Pipettierroboters benötigte man größere Volumina als wenn per Hand verdaut wurde. Der Roboter kann nur gewisse Mindestvolumina pipettieren, da er bei dieser Anwendung mit den Pipettenspitzen nicht bis auf den Boden der Vertiefungen fahren kann (Gefahr des Verstopfens durch Gelstücke, bzw. deren Übertrag in eine andere Kuhle). In der folgenden Tabelle sind die einzelnen Verdauschritte chronologisch aufgelistet (abgewandelt von Shevchenko et al., 1996):

Schritt	Beschreibung	Vol. [µl]	Zeit [min]	Temp. [°C]
1.	Silberentfärbung, 1:1 Mischung aus 30 mM Kaliumhexacyanoferrat(III), $K_3Fe(CN)_6$ und 100 mM Natriumbiosulfat, $Na_2S_2O_3$	130	10	21
2.	3x Waschen (MilliQ Wasser)	200	15	21
3.	3x Waschen (50% ACN, 12,5 mM NH_4HCO_3)	150	15	21
4.	2x Dehydrieren (100% ACN)	150	10	21
5.	Trocknen der Gelstücke	--	20	56
6.	Reduzieren (10 mM DTT, 50 mM NH_4HCO_3)	100	60	58
7.	Dehydrieren (100% ACN)	200	10	21
8.	Alkylieren (55 mM IAA, 50 mM NH_4HCO_3)	100	45	21
9.	2x Waschen (50 mM NH_4HCO_3)	150	5	21
10.	Dehydrieren (100% ACN)	150	5	21
11.	Quellen (50 mM NH_4HCO_3)	200	5	21
12.	Dehydrieren (100% ACN)	200	10	21
13.	Trocknen der Gelstücke	--	25	56
14.	Zugabe Trypsin (10% ACN, 25 mM NH_4HCO_3 , 12,5 ng/µl Trypsin)	17	45	4
15.	Verdaupuffer (10% ACN, 25 mM NH_4HCO_3)	50	0,1	4
16.	Abnehmen von überschüssigem Trypsin	30	--	--
17.	Verdau	--	720	38
18.	Verdau stoppen (0,5% FA)	40	--	--
19.	Verdauüberstand in neuer Platte/ neuem Cap sammeln	110	--	21
20.	Gelextraktion 1 (70% ACN, 1% FA) danach auf die neue Platte / das neue Cap überführen	70	20	21
21.	2x Gelextraktion 2 (100% ACN, 1% FA) danach auf die neue Platte / das neue Cap überführen	70	20	21
22.	Extraktionen in der Speed Vac trocknen	--	--	--

6.6.2 Tryptischer In-Lösung-Verdau

Auch beim In-Lösung-Verdau wurde die Protease Trypsin eingesetzt. Als Proben dienten die Strep-Elutionen der Reinigung über die Strep-Tactin-Säulen, da diese wesentlich weniger unspezifische Bindungen aufwiesen als die Reinigung der Komplexe über die Strep-Tactin-Suspension. Die Elutionen wurden mit Hilfe von Vivaspin 500 Zentrifugalfiltereinheiten (MWCO 5000 Da) aufkonzentriert. Dazu wurden die Elutionen in diese Filtereinheiten eingefüllt und für mindestens 30 Minuten mit 10000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Rückstand, der nicht durch den Filter geflossen war, enthielt die aufkonzentrierte Probe.

Im Folgenden sind die einzelnen Verdauerschritte chronologisch aufgelistet, wobei von einer 60 µl Strep-Tag-Elution ausgegangen wird. Bei größerem Probenvolumen wurde das Protokoll dementsprechend angepasst. Es wurde aufgrund des geringen Probenmaterials keine Proteinkonzentration bestimmt:

Schritt	Beschreibung
1.	<i>Aufkonzentration der Probe auf ein Drittel ihres Ausgangsvolumens mit Hilfe von Vivaspin 500 Zentrifugalfiltereinheiten</i>
2.	<i>Zugabe von 60 µl Probenpuffer</i>
3.	<i>Denaturieren der Probe 1 Stunde bei 60 °C unter konstantem Schütteln mit 550 rpm</i>
4.	<i>Abkühlen der Probe, kurzes Zentrifugieren</i>
5.	<i>Reduzieren: Zugabe von 5 µl DTT-Lösung, mischen, 1 Stunde bei 37 °C unter konstantem Schütteln mit 550 rpm</i>
6.	<i>Alkylieren: Zugabe von 50 µl IAA-Lösung, mischen, 1 Stunde bei 25 °C im Dunkeln unter konstantem Schütteln mit 550 rpm</i>
7.	<i>Abfangen von nicht reagiertem IAA: Zugabe von 20 µl DTT-Lösung, mischen, 1 Stunde bei 25 °C unter konstantem Schütteln mit 550 rpm</i>
8.	<i>Verdau: 1 µl Trypsin Stammlösung zu der Probe über Nacht bei 37 °C am nächsten Tag abstoppen mit 1 µl 100% FA</i>

6.6.3 „Dried droplet“ Präparation

Für die Messung der Proben wurde die „Dried droplet“ Matrixpräparation mit α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure (α -CHCA) durchgeführt. α -CHCA wurde in einer Konzentration von ca. 3-4 mg/ml in einer Lösung aus 50% Acetonitril (v/v) / 0,1% (v/v) TFA gelöst. Die eingetrockneten Peptidmischungen aus dem Verdau wurden in 5-10 μ l einer Lösung aus 50% Acetonitril (v/v) / 0,5% Ameisensäure rückgelöst. Es wurden 0,5 μ l Matrixlösung auf einem Probenteller aus Stahl vorgelegt und direkt auf diesen Tropfen 0,5 μ l der Peptidlösung pipettiert. Die Matrixlösung vermischt sich mit der Probenlösung und der Tropfen trocknet auf dem Stahlsteller ein. Da die α -CHCA-Matrix unlöslich in Wasser ist, konnte der kristalline Rückstand mit 5 μ l 5% iger (v/v) Ameisensäure pro Präparations-Spot gewaschen werden. Nach 5 Sekunden konnte der Tropfen seitlich mit Zellstoff abgesogen werden.

6.6.4 MALDI-TOF Messung von Peptiden

Für die Aufnahme der Massenspektren der tryptischen Peptide wurde ein *4800 TOF/TOF Analyzer* von Applied Biosystems eingesetzt. Die Messungen wurden im positiven Reflektormodus durchgeführt. Der Aufnahmebereich wurde auf 700 – 5000 m/z gesetzt. Alle MS-Spektren von Proteinverdau wurden extern mit Hilfe eines Peptid-Standards (*Sequazyme™ Peptide Mass Standards Kit*, Applied Biosystems) kalibriert. Es wurde eine Massengenauigkeit von 50 ppm erreicht. Es kam jedoch auch vor, dass die Obergrenze bei 100 ppm lag. Dies war zum Beispiel bei Proben mit einem hohen Salzgehalt der Fall, wie es bei einem In-Gel-Verdau von Proteinen vorkommen kann. Je nach Qualität des Spektrums wurden 1000 – 3000 Einzelspektren aufsummiert.

6.6.5 nLC-MALDI-MS/MS

Der Aufbau und die Einstellung der nLC-Anlage, die Gerätekonfiguration und die Datenerfassung entsprachen den Angaben der Publikation von Benjamin Rietschel und seinen Kollegen (Rietschel et al., 2009)

6.6.6 Auswertung und Datenbanksuche

MALDI-TOF Messung von Peptiden

Die abschließende Bearbeitung der Massenspektren erfolgte mit der Software Data Explorer Version 4.6. Für die Datenbanksuche wurde die MASCOT™ Datenbank Suchmaschine v2.2.03 (Matrix Science Ltd., UK; Perkins et al., 1999) verwendet. Folgende Suchparameter wurden eingestellt: Es wurde die Datenbank SwissProt (SwissProt 51.6, 257964 Sequenzen) und der Organismus Homo sapiens (15720 Sequenzen) ausgewählt. Trypsin wurde als Enzym gewählt. Als fixe Modifikation wurde die Carbamidomethylierung der Cysteine angegeben und die Methioninoxidation als variable Modifikation. Es wurde mit 2 überlesenen Schnittstellen („missed cleavages“) und einer Massentoleranz von 50 ppm gesucht.

nLC-MALDI-MS/MS

Es wurden mit Hilfe des Features *Peaks2Mascot* MGF- Dateien (Mascot Generic Format) aus den einzelnen nLC-MALDI-Läufen generiert, wobei pro MS/MS-Spektrum bis zu 65 Peaks mit einem *signal to noise* über 5 einbezogen wurden. MS/MS-Peak-Listen von drei Läufen einer Probe wurden für die Datenbanksuche in einer MGF-Datei zusammengefasst.

Für die Datenbanksuche wurde die MASCOT™ Datenbank Suchmaschine v2.2.03 (Matrix Science Ltd., UK; Perkins et al., 1999) verwendet. Folgende Suchparameter wurden eingestellt: Es wurde die Datenbank SwissProt (SwissProt 51.6, 257964 Sequenzen) und der Organismus Homo sapiens (15720 Sequenzen) ausgewählt. Trypsin wurde als Enzym gewählt. Als fixe Modifikation wurde die Carbamidomethylierung der Cysteine angegeben und die Methioninoxidation als variable Modifikation. Es wurde mit 2 überlesenen Schnittstellen („missed cleavages“), einer Peptidmassentoleranz für den *Precursor* von 30ppm und einer MS/MS-Toleranz von 0,3 Da für die Fragmente gesucht.

7 Literaturverzeichnis

- Abramovich, C., and Humphries, R. K. (2005). Hox regulation of normal and leukemic hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol* *12*, 210-216.
- Aebersold, R. H., Leavitt, J., Saavedra, R. A., Hood, L. E., and Kent, S. B. (1987). Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one- or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 6970-6974.
- Anderson, N. L., and Anderson, N. G. (2002). The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics* *1*, 845-867.
- Ayton, P. M., and Cleary, M. L. (2003). Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes Dev* *17*, 2298-2307.
- Barboric, M., Nissen, R. M., Kanazawa, S., Jabrane-Ferrat, N., and Peterlin, B. M. (2001). NF-kappaB binds P-TEFb to stimulate transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell* *8*, 327-337.
- Barkett, M., and Gilmore, T. D. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* *18*, 6910-6924.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* *116*, 281-297.
- Bauer, A., and Kuster, B. (2003). Affinity purification-mass spectrometry. Powerful tools for the characterization of protein complexes. *Eur J Biochem* *270*, 570-578.
- Beavis, R. C., and Chait, B. T. (1989). Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* *3*, 432-435.
- Beavis, R. C., Chaudhary, T., and Chait, B. T. (1992). alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Org Mass Spectrom* *27*, 156-158.
- Bertrand, F. E., Spengeman, J. D., Shah, N., and LeBien, T. W. (2003). B-cell development in the presence of the MLL/AF4 oncoprotein proceeds in the absence of HOX A7 and HOX A9 expression. *Leukemia* *17*, 2454-2459.
- Biondi, A., Cimino, G., Pieters, R., and Pui, C. H. (2000). Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* *96*, 24-33.
- Birke, M., Schreiner, S., Garcia-Cuellar, M. P., Mahr, K., Titgemeyer, F., and Slany, R. K. (2002). The MT domain of the proto-oncoprotein MLL binds to CpG-containing DNA and discriminates against methylation. *Nucleic Acids Res* *30*, 958-965.
- Bitoun, E., Oliver, P. L., and Davies, K. E. (2007). The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling. *Hum Mol Genet* *16*, 92-106.
- Borer, R. A., Lehner, C. F., Eppenberger, H. M., and Nigg, E. A. (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* *56*, 379-390.
- Borkhardt, A., Wuchter, C., Viehmann, S., Pils, S., Teigler-Schlegel, A., Stanulla, M., Zimmermann, M., Ludwig, W. D., Janka-Schaub, G., Schrappe, M., and Harbott, J. (2002). Infant acute lymphoblastic leukemia - combined cytogenetic, immunophenotypic and molecular analysis of 77 cases. *Leukemia* *16*, 1685-1690.
- Brizzard, B. L., Chubet, R. G., and Vizard, D. L. (1994). Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution. *BioTechniques* *16*, 730-735.
- Brown, R. S., and Lennon, J. J. (1995). Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer. *Anal Chem* *67*, 1998-2003.

- Bursen, A., Moritz, S., Gaussmann, A., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2004). Interaction of AF4 wild-type and AF4.MLL fusion protein with SIAH proteins: indication for t(4;11) pathobiology? *Oncogene* *23*, 6237-6249.
- Bursen, A., Schwabe, K., Rüster, B., Henschler, R., Ruthardt, M., Dingermann, T., and Marschalek, R. (June 2009). The AF4-MLL fusion protein is capable of inducing ALL in mice without requirement of MLL-AF4. *Blood* (submitted)
- Butler, L. H., Slany, R., Cui, X., Cleary, M. L., and Mason, D. Y. (1997). The HRX proto-oncogene product is widely expressed in human tissues and localizes to nuclear structures. *Blood* *89*, 3361-3370.
- Caslini, C., Serna, A., Rossi, V., Introna, M., and Biondi, A. (2004). Modulation of cell cycle by graded expression of MLL-AF4 fusion oncoprotein. *Leukemia* *18*, 1064-1071.
- Caslini, C., Yang, Z., El-Osta, M., Milne, T. A., Slany, R. K., and Hess, J. L. (2007). Interaction of MLL amino terminal sequences with menin is required for transformation. *Cancer Res* *67*, 7275-7283.
- Chakrabarti, L., Knight, S. J., Flannery, A. V., and Davies, K. E. (1996). A candidate gene for mild mental handicap at the FRAXE fragile site. *Hum Mol Genet* *5*, 275-282.
- Chandrasekharappa, S. C., Guru, S. C., Manickam, P., Olufemi, S. E., Collins, F. S., Emmert-Buck, M. R., Debelenko, L. V., Zhuang, Z., Lubensky, I. A., Liotta, L. A., *et al.* (1997). Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science* *276*, 404-407.
- Chao, S. H., and Price, D. H. (2001). Flavopiridol inactivates P-TEFb and blocks most RNA polymerase II transcription in vivo. *J Biol Chem* *276*, 31793-31799.
- Chen, C. S., Hilden, J. M., Frestedt, J., Domer, P. H., Moore, R., Korsmeyer, S. J., and Kersey, J. H. (1993a). The chromosome 4q21 gene (AF-4/FEL) is widely expressed in normal tissues and shows breakpoint diversity in t(4;11)(q21;q23) acute leukemia. *Blood* *82*, 1080-1085.
- Chen, C. S., Sorensen, P. H., Domer, P. H., Reaman, G. H., Korsmeyer, S. J., Heerema, N. A., Hammond, G. D., and Kersey, J. H. (1993b). Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* *81*, 2386-2393.
- Chen, J., Santillan, D. A., Koonce, M., Wei, W., Luo, R., Thirman, M. J., Zeleznik-Le, N. J., and Diaz, M. O. (2008). Loss of MLL PHD finger 3 is necessary for MLL-ENL-induced hematopoietic stem cell immortalization. *Cancer Res* *68*, 6199-6207.
- Chen, W., Li, Q., Hudson, W. A., Kumar, A., Kirchhof, N., and Kersey, J. H. (2006). A murine Mll-AF4 knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy. *Blood* *108*, 669-677.
- Chu, C. Y., and Rana, T. M. (2006). Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol* *4*, e210.
- Cimino, G., Moir, D. T., Canaani, O., Williams, K., Crist, W. M., Katzav, S., Cannizzaro, L., Lange, B., Nowell, P. C., Croce, C. M., and *et al.* (1991). Cloning of ALL-1, the locus involved in leukemias with the t(4;11)(q21;q23), t(9;11)(p22;q23), and t(11;19)(q23;p13) chromosome translocations. *Cancer Res* *51*, 6712-6714.
- Cleary, M. L. (1991). Oncogenic conversion of transcription factors by chromosomal translocations. *Cell* *66*, 619-622.
- Comisarow, M.B., and Marshall A.G. (1974) Fourier transform ion cyclotron resonance spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* *25*, 282-283
- Consortium, I. H. G. S. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* *431*, 931-945.
- Corral, J., Lavenir, I., Impey, H., Warren, A. J., Forster, A., Larson, T. A., Bell, S., McKenzie, A. N., King, G., and Rabbitts, T. H. (1996). An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell* *85*, 853-861.

- Corthals, G. L., Aebersold, R., and Goodlett, D. R. (2005). Identification of phosphorylation sites using microimmobilized metal affinity chromatography. *Methods Enzymol* *405*, 66-81.
- Dahmus, M. E. (1996). Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* *271*, 19009-19012.
- Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R. C., and Croce, C. M. (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *79*, 7824-7827.
- Dey, A., Chitsaz, F., Abbasi, A., Misteli, T., and Ozato, K. (2003). The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 8758-8763.
- Dey, A., Ellenberg, J., Farina, A., Coleman, A. E., Maruyama, T., Sciortino, S., Lippincott-Schwartz, J., and Ozato, K. (2000). A bromodomain protein, MCAP, associates with mitotic chromosomes and affects G(2)-to-M transition. *Mol Cell Biol* *20*, 6537-6549.
- Dhalluin, C., Carlson, J. E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A. K., and Zhou, M. M. (1999). Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* *399*, 491-496.
- Dhar, S. K., Lynn, B. C., Daosukho, C., and St Clair, D. K. (2004). Identification of nucleophosmin as an NF-kappaB co-activator for the induction of the human SOD2 gene. *J Biol Chem* *279*, 28209-28219.
- DiMartino, J. F., Ayton, P. M., Chen, E. H., Naftzger, C. C., Young, B. D., and Cleary, M. L. (2002). The AF10 leucine zipper is required for leukemic transformation of myeloid progenitors by MLL-AF10. *Blood* *99*, 3780-3785.
- DiMartino, J. F., Miller, T., Ayton, P. M., Landewe, T., Hess, J. L., Cleary, M. L., and Shilatifard, A. (2000). A carboxy-terminal domain of ELL is required and sufficient for immortalization of myeloid progenitors by MLL-ELL. *Blood* *96*, 3887-3893.
- Djabali, M., Selleri, L., Parry, P., Bower, M., Young, B. D., and Evans, G. A. (1992). A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. *Nat Genet* *2*, 113-118.
- Domer, P. H., Fakharzadeh, S. S., Chen, C. S., Jockel, J., Johansen, L., Silverman, G. A., Kersey, J. H., and Korsmeyer, S. J. (1993). Acute mixed-lineage leukemia t(4;11)(q21;q23) generates an MLL-AF4 fusion product. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 7884-7888.
- Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L., Mobley, R.C., Ferguson, L.D., and Alice, M.B. (1968). Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* *49*, 2240-2249.
- Dou, Y., Milne, T. A., Ruthenburg, A. J., Lee, S., Lee, J. W., Verdine, G. L., Allis, C. D., and Roeder, R. G. (2006). Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat Struct Mol Biol* *13*, 713-719.
- Dou, Y., Milne, T. A., Tackett, A. J., Smith, E. R., Fukuda, A., Wysocka, J., Allis, C. D., Chait, B. T., Hess, J. L., and Roeder, R. G. (2005). Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell* *121*, 873-885.
- Drews, J. (2000). Drug discovery: a historical perspective. *Science* *287*, 1960-1964.
- DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., and Calos, M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* *7*, 379-387.
- Dumbar, T. S., Gentry, G. A., and Olson, M. O. (1989). Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. *Biochemistry* *28*, 9495-9501.
- Eckerskorn, C., and Lottspeich, F. (1989). Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by gel electrophoresis after tryptic digestion in polyacrylamide matrix. *Chromatographia* *28*, 92-94.
- Eckerskorn, C., Strupat, K., Karas, M., Hillenkamp, F., and Lottspeich, F. (1992). Mass spectrometric analysis of blotted proteins after gel electrophoretic separation by matrix-assisted laser desorption/ionization. *Electrophoresis* *13*, 664-665.

- Eguchi, M., Eguchi-Ishimae, M., and Greaves, M. (2004). The small oligomerization domain of gephyrin converts MLL to an oncogene. *Blood* *103*, 3876-3882.
- Eirin-Lopez, J. M., Frehlick, L. J., and Ausio, J. (2006). Long-term evolution and functional diversification in the members of the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *Genetics* *173*, 1835-1850.
- Erfurth, F., Hemenway, C. S., de Erkenez, A. C., and Domer, P. H. (2004). MLL fusion partners AF4 and AF9 interact at subnuclear foci. *Leukemia* *18*, 92-102.
- Erfurth, F. E., Popovic, R., Grembecka, J., Cierpicki, T., Theisler, C., Xia, Z. B., Stuart, T., Diaz, M. O., Bushweller, J. H., and Zeleznik-Le, N. J. (2008). MLL protects CpG clusters from methylation within the *Hoxa9* gene, maintaining transcript expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 7517-7522.
- Ernst, P., Mabon, M., Davidson, A. J., Zon, L. I., and Korsmeyer, S. J. (2004). An Mll-dependent Hox program drives hematopoietic progenitor expansion. *Curr Biol* *14*, 2063-2069.
- Ernst, P., Wang, J., Huang, M., Goodman, R. H., and Korsmeyer, S. J. (2001). MLL and CREB bind cooperatively to the nuclear coactivator CREB-binding protein. *Mol Cell Biol* *21*, 2249-2258.
- Estable, M. C., Naghavi, M. H., Kato, H., Xiao, H., Qin, J., Vahlne, A., and Roeder, R. G. (2002). MCEF, the newest member of the AF4 family of transcription factors involved in leukemia, is a positive transcription elongation factor-b-associated protein. *J Biomed Sci* *9*, 234-245.
- Fair, K., Anderson, M., Bulanova, E., Mi, H., Tropschug, M., and Diaz, M. O. (2001). Protein interactions of the MLL PHD fingers modulate MLL target gene regulation in human cells. *Mol Cell Biol* *21*, 3589-3597.
- Farina, A., Hattori, M., Qin, J., Nakatani, Y., Minato, N., and Ozato, K. (2004). Bromodomain protein Brd4 binds to GTPase-activating SPA-1, modulating its activity and subcellular localization. *Mol Cell Biol* *24*, 9059-9069.
- Felix, C. A., Hosler, M. R., Slater, D. J., Megonigal, M. D., Lovett, B. D., Williams, T. M., Nowell, P. C., Spinner, N. B., Owens, N. L., Hoxie, J., *et al.* (1999). Duplicated regions of AF-4 intron 4 at t(4;11) translocation breakpoints. *Mol Diagn* *4*, 269-283.
- Felix, C. A., Lange, B. J., and Chessells, J. M. (2000). Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: Challenges and Controversies in 2000. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 285-302.
- Felix, C. A., Lange, B. J., Hosler, M. R., Fertala, J., and Bjornsti, M. A. (1995). Chromosome band 11q23 translocation breakpoints are DNA topoisomerase II cleavage sites. *Cancer Res* *55*, 4287-4292.
- Fenn, J.B. (1988) Proc 36th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, San Francisco.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., and Whitehouse, C.M. (1989) Elektrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* *246*, 64-71.
- Fischer, F., Wolters, D., Rogner, M., and Poetsch, A. (2006). Toward the complete membrane proteome: high coverage of integral membrane proteins through transmembrane peptide detection. *Mol Cell Proteomics* *5*, 444-453.
- Frestedt, J. L., Hilden, J. M., Moore, R. O., and Kersey, J. H. (1996). Differential expression of AF4/FEL mRNA in human tissues. *Genet Anal* *12*, 147-149.
- Fu, J., Yoon, H. G., Qin, J., and Wong, J. (2007). Regulation of P-TEFb elongation complex activity by CDK9 acetylation. *Mol Cell Biol* *27*, 4641-4651.
- Garcia-Cuellar, M. P., Zilles, O., Schreiner, S. A., Birke, M., Winkler, T. H., and Slany, R. K. (2001). The ENL moiety of the childhood leukemia-associated MLL-ENL oncoprotein recruits human Polycomb 3. *Oncogene* *20*, 411-419.
- Garzon, R., Garofalo, M., Martelli, M. P., Briesewitz, R., Wang, L., Fernandez-Cymering, C., Volinia, S., Liu, C. G., Schnittger, S., Haferlach, T., *et al.* (2008). Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 3945-3950.

- Gaussmann, A., Wenger, T., Eberle, I., Bursen, A., Bracharz, S., Herr, I., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2007). Combined effects of the two reciprocal t(4;11) fusion proteins MLL-AF4 and AF4.MLL confer resistance to apoptosis, cell cycling capacity and growth transformation. *Oncogene* 26, 3352-3363.
- Gecz, J., Gedeon, A. K., Sutherland, G. R., and Mulley, J. C. (1996). Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation. *Nat Genet* 13, 105-108.
- Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-260.
- Goto, H., Motomura, S., Wilson, A. C., Freiman, R. N., Nakabeppu, Y., Fukushima, K., Fujishima, M., Herr, W., and Nishimoto, T. (1997). A single-point mutation in HCF causes temperature-sensitive cell-cycle arrest and disrupts VP16 function. *Genes Dev* 11, 726-737.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G., Rees, J., Hann, I., Stevens, R., Burnett, A., and Goldstone, A. (1998). The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92, 2322-2333.
- Grisendi, S., Bernardi, R., Rossi, M., Cheng, K., Khandker, L., Manova, K., and Pandolfi, P. P. (2005). Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* 437, 147-153.
- Grummitt, C. G., Townsley, F. M., Johnson, C. M., Warren, A. J., and Bycroft, M. (2008). Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. *J Biol Chem* 283, 23326-23332.
- Gu, Y., Nakamura, T., Alder, H., Prasad, R., Canaani, O., Cimino, G., Croce, C. M., and Canaani, E. (1992). The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to *Drosophila trithorax*, to the AF-4 gene. *Cell* 71, 701-708.
- Guenther, M. G., Jenner, R. G., Chevalier, B., Nakamura, T., Croce, C. M., Canaani, E., and Young, R. A. (2005). Global and Hox-specific roles for the MLL1 methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8603-8608.
- Han, J., and Schey, K. L. (2004). Proteolysis and mass spectrometric analysis of an integral membrane: aquaporin 0. *J Proteome Res* 3, 807-812.
- Hanson, R. D., Hess, J. L., Yu, B. D., Ernst, P., van Lohuizen, M., Berns, A., van der Lugt, N. M., Shashikant, C. S., Ruddle, F. H., Seto, M., and Korsmeyer, S. J. (1999). Mammalian Trithorax and polycomb-group homologues are antagonistic regulators of homeotic development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14372-14377.
- Harlow, E., Lane, D. (1988). *Antibodies - A laboratory manual*. 1st edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Heerema, N. A., Sather, H. N., Ge, J., Arthur, D. C., Hilden, J. M., Trigg, M. E., and Reaman, G. H. (1999). Cytogenetic studies of infant acute lymphoblastic leukemia: poor prognosis of infants with t(4;11) - a report of the Children's Cancer Group. *Leukemia* 13, 679-686.
- Hemenway, C. S., de Erkenez, A. C., and Gould, G. C. (2001). The polycomb protein MPc3 interacts with AF9, an MLL fusion partner in t(9;11)(p22;q23) acute leukemias. *Oncogene* 20, 3798-3805.
- Henry, K.D., Williams, E.R., Wang, B.H., McLafferty, F.W., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. (1989) Fourier-Transform Mass Spectrometry of Large Molecules by Electrospray Ionization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9075-9078
- Henzel, W. J., Billeci, T. M., Stults, J. T., Wong, S. C., Grimley, C., and Watanabe, C. (1993). Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5011-5015.

- Herrera, J. E., Savkur, R., and Olson, M. O. (1995). The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. *Nucleic Acids Res* *23*, 3974-3979.
- Hillman, M. A., and Gecz, J. (2001). Fragile XE-associated familial mental retardation protein 2 (FMR2) acts as a potent transcription activator. *J Hum Genet* *46*, 251-259.
- Hoffbrand, A. V., Pettit, J. E., Moss, P. A. H., and Hoelzer, D. (2003). *Grundkurs Hämatologie*. 2. Auflage, Blackwell Verlag GmbH
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., and Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* *284*, 1313-1318.
- House, C. M., Frew, I. J., Huang, H. L., Wiche, G., Traficante, N., Nice, E., Catimel, B., and Bowtell, D. D. (2003). A binding motif for Siah ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 3101-3106.
- Hsieh, J. J., Cheng, E. H., and Korsmeyer, S. J. (2003a). Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell* *115*, 293-303.
- Hsieh, J. J., Ernst, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S. J. (2003b). Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization. *Mol Cell Biol* *23*, 186-194.
- Huang, B., Yang, X., Zhou, M. M., Ozato, K., and Chen, L. F. (2008). Brd4 Coactivates Transcriptional Activation of NF- κ B Via Specific Binding to Acetylated RelA. *Mol Cell Biol*.
- Hughes, C. M., Rozenblatt-Rosen, O., Milne, T. A., Copeland, T. D., Levine, S. S., Lee, J. C., Hayes, D. N., Shanmugam, K. S., Bhattacharjee, A., Biondi, C. A., *et al.* (2004). Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the hoxc8 locus. *Mol Cell* *13*, 587-597.
- Huret, J. L., Dessen, P., and Bernheim, A. (2001). An atlas of chromosomes in hematological malignancies. Example: 11q23 and MLL partners. *Leukemia* *15*, 987-989.
- Isaacs, A. M., Oliver, P. L., Jones, E. L., Jeans, A., Potter, A., Hovik, B. H., Nolan, P. M., Vizer, L., Glenister, P., Simon, A. K., *et al.* (2003). A mutation in Af4 is predicted to cause cerebellar ataxia and cataracts in the robotic mouse. *J Neurosci* *23*, 1631-1637.
- Isnard, P., Core, N., Naquet, P., and Djabali, M. (2000). Altered lymphoid development in mice deficient for the mAF4 proto-oncogene. *Blood* *96*, 705-710.
- Isnard, P., Depetris, D., Mattei, M. G., Ferrier, P., and Djabali, M. (1998). cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the murine AF-4 gene involved in human leukemia. *Mamm Genome* *9*, 1065-1068.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., and Sakaki, Y. (2001). A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 4569-4574.
- Jang, M. K., Mochizuki, K., Zhou, M., Jeong, H. S., Brady, J. N., and Ozato, K. (2005). The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Mol Cell* *19*, 523-534.
- Jaskolla, T. W., and Karas, M. (2008). Using fluorescence dyes as a tool for analyzing the MALDI process. *J Am Soc Mass Spectrom* *19*, 1054-1061.
- Jaskolla, T. W., Lehmann, W. D., and Karas, M. (2008). 4-Chloro-alpha-cyanocinnamic acid is an advanced, rationally designed MALDI matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 12200-12205.
- Johansson, B., Mertens, F., and Mitelman, F. (1996). Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities--balanced rearrangements vs. genomic imbalances? *Genes Chromosomes Cancer* *16*, 155-163.
- Johansson, B., Moorman, A. V., Haas, O. A., Watmore, A. E., Cheung, K. L., Swanton, S., and Secker-Walker, L. M. (1998). Hematologic malignancies with t(4;11)(q21;q23)--a cytogenetic, morphologic, immunophenotypic and clinical study of 183 cases. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia* *12*, 779-787.

- Johnson, R. S., Martin, S. A., Biemann, K., Stults, J. T., and Watson, J. T. (1987). Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal Chem* *59*, 2621-2625.
- Jones, B., Su, H., Bhat, A., Lei, H., Bajko, J., Hevi, S., Baltus, G. A., Kadam, S., Zhai, H., Valdez, R., *et al.* (2008). The histone H3K79 methyltransferase Dot1L is essential for mammalian development and heterochromatin structure. *PLoS Genet* *4*, e1000190.
- Julien, E., and Herr, W. (2004). A switch in mitotic histone H4 lysine 20 methylation status is linked to M phase defects upon loss of HCF-1. *Mol Cell* *14*, 713-725.
- Junttila, M. R., Saarinen, S., Schmidt, T., Kast, J., and Westermarck, J. (2005). Single-step Strep-tag purification for the isolation and identification of protein complexes from mammalian cells. *Proteomics* *5*, 1199-1203.
- Kanno, T., Kanno, Y., Siegel, R. M., Jang, M. K., Lenardo, M. J., and Ozato, K. (2004). Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells. *Mol Cell* *13*, 33-43.
- Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., and Hillenkamp, F. (1987). Matrix-Assisted Ultraviolet Laser Desorption of Non-Volatile Compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Process* *78*, 53-68.
- Karas, M., Gluckmann, M., and Schafer, J. (2000). Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom* *35*, 1-12.
- Karas, M., and Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* *60*, 2299-2301.
- Karas, M., and Kruger, R. (2003). Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. *Chem Rev* *103*, 427-440.
- Karin, M., and Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* *18*, 621-663.
- Kaufmann, R., Spengler, B., and Lutzenkirchen, F. (1993). Mass spectrometric sequencing of linear peptides by product-ion analysis in a reflectron time-of-flight mass spectrometer using matrix-assisted laser desorption ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom* *7*, 902-910.
- Kersey, J. H., Wang, D., and Oberto, M. (1998). Resistance of t(4;11) (MLL-AF4 fusion gene) leukemias to stress-induced cell death: possible mechanism for extensive extramedullary accumulation of cells and poor prognosis. *Leukemia* *12*, 1561-1564.
- Kowarz, E., Burmeister, T., Lo Nigro, L., Jansen, M. W., Delabesse, E., Klingebiel, T., Dingermann, T., Meyer, C., and Marschalek, R. (2007). Complex MLL rearrangements in t(4;11) leukemia patients with absent AF4.MLL fusion allele. *Leukemia* *21*, 1232-1238.
- Krivtsov, A. V., Feng, Z., Lemieux, M. E., Faber, J., Vempati, S., Sinha, A. U., Xia, X., Jesneck, J., Bracken, A. P., Silverman, L. B., *et al.* (2008). H3K79 methylation profiles define murine and human MLL-AF4 leukemias. *Cancer Cell* *14*, 355-368.
- Laible, G., Wolf, A., Dorn, R., Reuter, G., Nislow, C., Lebersorger, A., Popkin, D., Pillus, L., and Jenuwein, T. (1997). Mammalian homologues of the Polycomb-group gene Enhancer of zeste mediate gene silencing in *Drosophila* heterochromatin and at *S. cerevisiae* telomeres. *Embo J* *16*, 3219-3232.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* *409*, 860-921.
- Lavau, C., Luo, R. T., Du, C., and Thirman, M. J. (2000). Retrovirus-mediated gene transfer of MLL-ELL transforms primary myeloid progenitors and causes acute myeloid leukemias in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 10984-10989.

- Lavau, C., Szilvassy, S. J., Slany, R., and Cleary, M. L. (1997). Immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced HRX-ENL. *Embo J* 16, 4226-4237.
- Lemmens, I., Van de Ven, W. J., Kas, K., Zhang, C. X., Giraud, S., Wautot, V., Buisson, N., De Witte, K., Salandre, J., Lenoir, G., *et al.* (1997). Identification of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. The European Consortium on MEN1. *Hum Mol Genet* 6, 1177-1183.
- Li, Y. P., Busch, R. K., Valdez, B. C., and Busch, H. (1996). C23 interacts with B23, a putative nucleolar-localization-signal-binding protein. *Eur J Biochem* 237, 153-158.
- Lin, C. Y., Liang, Y. C., and Yung, B. Y. (2006). Nucleophosmin/B23 regulates transcriptional activation of E2F1 via modulating the promoter binding of NF-kappaB, E2F1 and pRB. *Cell Signal* 18, 2041-2048.
- Litt, M., Qiu, Y., and Huang, S. (2009). Histone arginine methylations: their roles in chromatin dynamics and transcriptional regulation. *Biosci Rep* 29, 131-141.
- Look, A. T. (1997). Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278, 1059-1064.
- Lottspeich, F. (1999). Proteome Analysis: A Pathway to the Functional Analysis of Proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* 38, 2476-2492.
- Ma, C., and Staudt, L. M. (1996). LAF-4 encodes a lymphoid nuclear protein with transactivation potential that is homologous to AF-4, the gene fused to MLL in t(4;11) leukemias. *Blood* 87, 734-745.
- Ma, Q., Alder, H., Nelson, K. K., Chatterjee, D., Gu, Y., Nakamura, T., Canaani, E., Croce, C. M., Siracusa, L. D., and Buchberg, A. M. (1993). Analysis of the murine All-1 gene reveals conserved domains with human ALL-1 and identifies a motif shared with DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6350-6354.
- Makarov A. (2000) Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Anal. Chem.* 72, 1156-1162.
- Mamyrin, B. A., Karataev, V. I., Shmikk, D. V., and Zagulin, V. A. (1973). The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Sov Phys JETP* 37, 45.
- Mann, M., Hojrup, P., and Roepstorff, P. (1993). Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol Mass Spectrom* 22, 338-345.
- Marschalek, R., Nilson, I., Lochner, K., Greim, R., Siegler, G., Greil, J., Beck, J. D., and Fey, G. H. (1997). The structure of the human ALL-1/MLL/HRX gene. *Leuk Lymphoma* 27, 417-428.
- Martin, C., and Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 838-849.
- Martin, M. E., Milne, T. A., Bloyer, S., Galoian, K., Shen, W., Gibbs, D., Brock, H. W., Slany, R., and Hess, J. L. (2003). Dimerization of MLL fusion proteins immortalizes hematopoietic cells. *Cancer Cell* 4, 197-207.
- Maruyama, T., Farina, A., Dey, A., Cheong, J., Bermudez, V. P., Tamura, T., Sciortino, S., Shuman, J., Hurwitz, J., and Ozato, K. (2002). A Mammalian bromodomain protein, brd4, interacts with replication factor C and inhibits progression to S phase. *Mol Cell Biol* 22, 6509-6520.
- Matsudaira, P. (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J Biol Chem* 262, 10035-10038.
- Metzler, M., Forster, A., Pannell, R., Arends, M. J., Daser, A., Lobato, M. N., and Rabbitts, T. H. (2006). A conditional model of MLL-AF4 B-cell tumorigenesis using inverter technology. *Oncogene* 25, 3093-3103.
- Meyer, C., Kowarz, E., Hofmann, J., Renneville, A., Zuna, J., Trka, J., Ben Abdelali, R., Macintyre, E., De Braekeleer, E., De Braekeleer, M., *et al.* (2009). New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia*.

- Meyer, C., Kowarz, E., Schneider, B., Oehm, C., Klingebiel, T., Dingermann, T., and Marschalek, R. (2006). Genomic DNA of leukemic patients: target for clinical diagnosis of MLL rearrangements. *Biotechnol J* 1, 656-663.
- Meyer, C., and Marschalek, R. (2009). LDI-PCR: identification of known and unknown gene fusions of the human MLL gene. *Methods Mol Biol* 538, 71-83.
- Meyer, C., Schneider, B., Reichel, M., Angermueller, S., Strehl, S., Schnittger, S., Schoch, C., Jansen, M. W., van Dongen, J. J., Pieters, R., *et al.* (2005). Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 449-454.
- Michels, A. A., Fraldi, A., Li, Q., Adamson, T. E., Bonnet, F., Nguyen, V. T., Sedore, S. C., Price, J. P., Price, D. H., Lania, L., and Bensaude, O. (2004). Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor. *Embo J* 23, 2608-2619.
- Milne, T. A., Briggs, S. D., Brock, H. W., Martin, M. E., Gibbs, D., Allis, C. D., and Hess, J. L. (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* 10, 1107-1117.
- Milne, T. A., Hughes, C. M., Lloyd, R., Yang, Z., Rozenblatt-Rosen, O., Dou, Y., Schnepf, R. W., Krankel, C., Livolsi, V. A., Gibbs, D., *et al.* (2005). Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 749-754.
- Mitterbauer-Hohendanner, G., and Mannhalter, C. (2004). The biological and clinical significance of MLL abnormalities in haematological malignancies. *Eur J Clin Invest* 34 *Suppl* 2, 12-24.
- Morris, S. W., Kirstein, M. N., Valentine, M. B., Dittmer, K. G., Shapiro, D. N., Saltman, D. L., and Look, A. T. (1994). Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 263, 1281-1284.
- Morrissey, J., Tkachuk, D. C., Milatovich, A., Francke, U., Link, M., and Cleary, M. L. (1993). A serine/proline-rich protein is fused to HRX in t(4;11) acute leukemias. *Blood* 81, 1124-1131.
- Mueller, D., Bach, C., Zeisig, D., Garcia-Cuellar, M. P., Monroe, S., Sreekumar, A., Zhou, R., Nesvizhskii, A., Chinnaiyan, A., Hess, J. L., and Slany, R. K. (2007). A role for the MLL fusion partner ENL in transcriptional elongation and chromatin modification. *Blood* 110, 4445-4454.
- Muntean, A. G., Giannola, D., Udager, A. M., and Hess, J. L. (2008). The PHD fingers of MLL block MLL fusion protein-mediated transformation. *Blood* 112, 4690-4693.
- Nagy, P. L., Griesenbeck, J., Kornberg, R. D., and Cleary, M. L. (2002). A trithorax-group complex purified from *Saccharomyces cerevisiae* is required for methylation of histone H3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 90-94.
- Nakamura, T., Canaani, E., and Croce, C. M. (2007). Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10980-10985.
- Nakamura, T., Mori, T., Tada, S., Krajewski, W., Rozovskaia, T., Wassell, R., Dubois, G., Mazo, A., Croce, C. M., and Canaani, E. (2002). ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* 10, 1119-1128.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.
- Neuhoff, V., Stamm, R., and Eibl, H. (1985). Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* 6, 427-448.
- Niedzielski, M. F., Hopewell, R., Ismail, Z., and Estable, M. C. (2007). MCEF is localized to the nucleus by protein sequences encoded within three distinct exons, where it represses HIV-1 Tat-transactivation of LTR-directed transcription. *Int J Biol Sci* 3, 225-236.
- Nilson, I., Lochner, K., Siegler, G., Greil, J., Beck, J. D., Fey, G. H., and Marschalek, R. (1996). Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukaemias. *Br J Haematol* 93, 966-972.

- Nilson, I., Reichel, M., Ennas, M. G., Greim, R., Knorr, C., Siegler, G., Greil, J., Fey, G. H., and Marschalek, R. (1997). Exon/intron structure of the human AF-4 gene, a member of the AF-4/LAF-4/FMR-2 gene family coding for a nuclear protein with structural alterations in acute leukaemia. *Br J Haematol* *98*, 157-169.
- Nühse, T., Yu, K., and Salomon, A. (2007). Isolation of phosphopeptides by immobilized metal ion affinity chromatography. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 18*, Unit 18 13.
- Okada, Y., Feng, Q., Lin, Y., Jiang, Q., Li, Y., Coffield, V. M., Su, L., Xu, G., and Zhang, Y. (2005). hDOT1L links histone methylation to leukemogenesis. *Cell* *121*, 167-178.
- Okuda, M., Horn, H. F., Tarapore, P., Tokuyama, Y., Smulian, A. G., Chan, P. K., Knudsen, E. S., Hofmann, I. A., Snyder, J. D., Bove, K. E., and Fukasawa, K. (2000). Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* *103*, 127-140.
- Okuwaki, M., Matsumoto, K., Tsujimoto, M., and Nagata, K. (2001). Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett* *506*, 272-276.
- Oliver, P. L., Bitoun, E., Clark, J., Jones, E. L., and Davies, K. E. (2004). Mediation of Af4 protein function in the cerebellum by Siah proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 14901-14906.
- Oliver, P. L., Keays, D. A., and Davies, K. E. (2007). Behavioural characterisation of the robotic mouse mutant. *Behav Brain Res* *181*, 239-247.
- Olsen, J. V., Ong, S. E., and Mann, M. (2004). Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics* *3*, 608-614.
- Ono, R., Ihara, M., Nakajima, H., Ozaki, K., Kataoka-Fujiwara, Y., Taki, T., Nagata, K., Inagaki, M., Yoshida, N., Kitamura, T., *et al.* (2005). Disruption of Sept6, a fusion partner gene of MLL, does not affect ontogeny, leukemogenesis induced by MLL-SEPT6, or phenotype induced by the loss of Sept4. *Mol Cell Biol* *25*, 10965-10978.
- Ouchida, R., Kusuhara, M., Shimizu, N., Hisada, T., Makino, Y., Morimoto, C., Handa, H., Ohsuzu, F., and Tanaka, H. (2003). Suppression of NF-kappaB-dependent gene expression by a hexamethylene bisacetamide-inducible protein HEXIM1 in human vascular smooth muscle cells. *Genes Cells* *8*, 95-107.
- Pappin, D. J., Hojrup, P., and Bleasby, A. J. (1993). Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* *3*, 327-332.
- Patel, A., Vought, V. E., Dharmarajan, V., and Cosgrove, M. S. (2008). A conserved arginine-containing motif crucial for the assembly and enzymatic activity of the mixed lineage leukemia protein-1 core complex. *J Biol Chem* *283*, 32162-32175.
- Pedersen-Bjergaard, J., and Rowley, J. D. (1994). The balanced and the unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation. *Blood* *83*, 2780-2786.
- Peng, J., Zhu, Y., Milton, J. T., and Price, D. H. (1998). Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev* *12*, 755-762.
- Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., and Cottrell, J. S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* *20*, 3551-3567.
- Pirrotta, V. (1998). Polycomb the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing. *Cell* *93*, 333-336.
- Pluskal, M. G., Przekop, M. B., Kavonian, M. R., Vecoli, C., and Hicks, D. A. (1986). Immobilon (tm) PVDF Transfer Membrane: A New Membrane Substrate For Western Blotting of Proteins. *BioTechniques* *4*, 272-282.
- Prasad, R., Yano, T., Sorio, C., Nakamura, T., Rallapalli, R., Gu, Y., Leshkowitz, D., Croce, C. M., and Canaani, E. (1995). Domains with transcriptional regulatory activity within the ALL1 and AF4 proteins involved in acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 12160-12164.

- Pui, C. H., Chessells, J. M., Camitta, B., Baruchel, A., Biondi, A., Boyett, J. M., Carroll, A., Eden, O. B., Evans, W. E., Gadner, H., *et al.* (2003). Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. *Leukemia* *17*, 700-706.
- Pui, C. H., Frankel, L. S., Carroll, A. J., Raimondi, S. C., Shuster, J. J., Head, D. R., Crist, W. M., Land, V. J., Pullen, D. J., Steuber, C. P., and *et al.* (1991). Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11)(q21;q23): a collaborative study of 40 cases. *Blood* *77*, 440-447.
- Pui, C. H., Gaynon, P. S., Boyett, J. M., Chessells, J. M., Baruchel, A., Kamps, W., Silverman, L. B., Biondi, A., Harms, D. O., Vilmer, E., *et al.* (2002). Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet* *359*, 1909-1915.
- Rabbitts, T. H. (1991). Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias. *Cell* *67*, 641-644.
- Rabbitts, T. H. (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* *372*, 143-149.
- Rabbitts, T. H. (1999). Perspective: chromosomal translocations can affect genes controlling gene expression and differentiation--why are these functions targeted? *J Pathol* *187*, 39-42.
- Rasio, D., Schichman, S. A., Negrini, M., Canaani, E., and Croce, C. M. (1996). Complete exon structure of the ALL1 gene. *Cancer Res* *56*, 1766-1769.
- Reaman, G. H., Sposto, R., Sensel, M. G., Lange, B. J., Feusner, J. H., Heerema, N. A., Leonard, M., Holmes, E. J., Sather, H. N., Pendergrass, T. W., *et al.* (1999). Treatment outcome and prognostic factors for infants with acute lymphoblastic leukemia treated on two consecutive trials of the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol* *17*, 445-455.
- Redner, R. L., Rush, E. A., Faas, S., Rudert, W. A., and Corey, S. J. (1996). The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood* *87*, 882-886.
- Reichel, M., Gillert, E., Angermuller, S., Hensel, J. P., Heidel, F., Lode, M., Leis, T., Biondi, A., Haas, O. A., Strehl, S., *et al.* (2001). Biased distribution of chromosomal breakpoints involving the MLL gene in infants versus children and adults with t(4;11) ALL. *Oncogene* *20*, 2900-2907.
- Reichel, M., Gillert, E., Breitenlohner, I., Repp, R., Greil, J., Beck, J. D., Fey, G. H., and Marschalek, R. (1999). Rapid isolation of chromosomal breakpoints from patients with t(4;11) acute lymphoblastic leukemia: implications for basic and clinical research. *Cancer Res* *59*, 3357-3362.
- Renart, J., Reiser, J., and Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 3116-3120.
- Rietschel, B., Arrey, T. N., Meyer, B., Bornemann, S., Schuerken, M., Karas, M., and Poetsch, A. (2009). Elastase digests: new ammunition for shotgun membrane proteomics. *Mol Cell Proteomics* *8*, 1029-1043.
- Righetti, P. G., Castagna, A., Antonioli, P., and Boschetti, E. (2005). Prefractionation techniques in proteome analysis: the mining tools of the third millennium. *Electrophoresis* *26*, 297-319.
- Robert Koch Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2008). *Krebs in Deutschland. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage*
- Roepstorff, P., and Fohlman, J. (1984). Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed Mass Spectrom* *11*, 601.
- Rowley, J. D. (1992). The der(11) chromosome contains the critical breakpoint junction in the 4;11, 9;11, and 11;19 translocations in acute leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* *5*, 264-266.
- Rozenblatt-Rosen, O., Rozovskaia, T., Burakov, D., Sedkov, Y., Tillib, S., Blechman, J., Nakamura, T., Croce, C. M., Mazo, A., and Canaani, E. (1998). The C-terminal SET domains of ALL-1 and

- TRITHORAX interact with the INI1 and SNR1 proteins, components of the SWI/SNF complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 4152-4157.
- Rubnitz, J. E., Behm, F. G., and Downing, J. R. (1996). 11q23 rearrangements in acute leukemia. *Leukemia* *10*, 74-82.
- Ruthenburg, A. J., Wang, W., Graybosch, D. M., Li, H., Allis, C. D., Patel, D. J., and Verdine, G. L. (2006). Histone H3 recognition and presentation by the WDR5 module of the MLL1 complex. *Nat Struct Mol Biol* *13*, 704-712.
- Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Press.
- Sanchez-Garcia, I., and Rabbitts, T. H. (1993). LIM domain proteins in leukaemia and development. *Semin Cancer Biol* *4*, 349-358.
- Satijn, D. P., Gunster, M. J., van der Vlag, J., Hamer, K. M., Schul, W., Alkema, M. J., Saurin, A. J., Freemont, P. S., van Driel, R., and Otte, A. P. (1997). RING1 is associated with the polycomb group protein complex and acts as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol* *17*, 4105-4113.
- Savkur, R. S., and Olson, M. O. (1998). Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* *26*, 4508-4515.
- Schlosser, A., Vanselow, J. T., Kramer, A. (2005). Mapping of phosphorylation sites by a multi-protease approach with specific phosphopeptide enrichment and NanoLC-MS/MS analysis. *Anal Chem* *77*, 5243-50.
- Schmidt-Zachmann, M. S., Hugle-Dorr, B., and Franke, W. W. (1987). A constitutive nucleolar protein identified as a member of the nucleoplasmin family. *Embo J* *6*, 1881-1890.
- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., and Cavalli, G. (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* *128*, 735-745.
- Schulte, A., Czudnochowski, N., Barboric, M., Schonichen, A., Blazek, D., Peterlin, B. M., and Geyer, M. (2005). Identification of a cyclin T-binding domain in Hexim1 and biochemical analysis of its binding competition with HIV-1 Tat. *J Biol Chem* *280*, 24968-24977.
- Scott, M. G., Crimmins, D. L., McCourt, D. W., Tarrand, J. J., Eyerman, M. C., and Nahm, M. H. (1988). A simple in situ cyanogen bromide cleavage method to obtain internal amino acid sequence of proteins electroblotted to polyvinylidene difluoride membranes. *Biochem Biophys Res Commun* *155*, 1353-1359.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* *68*, 850-858.
- Shim, E. Y., Walker, A. K., Shi, Y., and Blackwell, T. K. (2002). CDK-9/cyclin T (P-TEFb) is required in two postinitiation pathways for transcription in the *C. elegans* embryo. *Genes Dev* *16*, 2135-2146.
- Slany, R. K., Lavau, C., and Cleary, M. L. (1998). The oncogenic capacity of HRX-ENL requires the transcriptional transactivation activity of ENL and the DNA binding motifs of HRX. *Mol Cell Biol* *18*, 122-129.
- So, C. W., Lin, M., Ayton, P. M., Chen, E. H., and Cleary, M. L. (2003). Dimerization contributes to oncogenic activation of MLL chimeras in acute leukemias. *Cancer Cell* *4*, 99-110.
- Song, J. J., and Kingston, R. E. (2008). WDR5 interacts with mixed lineage leukemia (MLL) protein via the histone H3-binding pocket. *J Biol Chem* *283*, 35258-35264.
- Spengler, B. (1997). Post-source decay analysis in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules. *J Mass Spectrom* *32*, 1019 - 1036.
- Spengler, B., Kirsch, D., and Kaufmann, R. (1992). Fundamental aspects of postsource decay in matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. 1. Residual gas effects. *J Phys Chem* *96*, 9678-9684.
- Srinivasan, R. S., de Erkenez, A. C., and Hemenway, C. S. (2003). The mixed lineage leukemia fusion partner AF9 binds specific isoforms of the BCL-6 corepressor. *Oncogene* *22*, 3395-3406.

- Srinivasan, R. S., Nesbit, J. B., Marrero, L., Erfurth, F., LaRussa, V. F., and Hemenway, C. S. (2004). The synthetic peptide PFWT disrupts AF4-AF9 protein complexes and induces apoptosis in t(4;11) leukemia cells. *Leukemia* 18, 1364-1372.
- Steger, D. J., Lefterova, M. I., Ying, L., Stonestrom, A. J., Schupp, M., Zhuo, D., Vakoc, A. L., Kim, J. E., Chen, J., Lazar, M. A., *et al.* (2008). DOT1L/KMT4 recruitment and H3K79 methylation are ubiquitously coupled with gene transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 28, 2825-2839.
- Strupat, K., Karas, M., and Hillenkamp, F. (1992). 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption—ionization mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom Ion Process* 111, 89-102.
- Strupat, K., Karas, M., Hillenkamp, F., Eckerskorn, C., and Lottspeich, F. (1994). Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of proteins electroblotted after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Chem* 66, 464-470.
- Szebeni, A., Herrera, J. E., and Olson, M. O. (1995). Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization signals. *Biochemistry* 34, 8037-8042.
- Takeda, S., Chen, D. Y., Westergard, T. D., Fisher, J. K., Rubens, J. A., Sasagawa, S., Kan, J. T., Korsmeyer, S. J., Cheng, E. H., and Hsieh, J. J. (2006). Proteolysis of MLL family proteins is essential for *taspase1*-orchestrated cell cycle progression. *Genes Dev* 20, 2397-2409.
- Taki, T., Kano, H., Taniwaki, M., Sako, M., Yanagisawa, M., and Hayashi, Y. (1999). AF5q31, a newly identified AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leukemia with *ins(5;11)(q31;q13q23)*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14535-14540.
- Tan, C. C., Sindhu, K. V., Li, S., Nishio, H., Stoller, J. Z., Oishi, K., Puttreddy, S., Lee, T. J., Epstein, J. A., Walsh, M. J., and Gelb, B. D. (2008). Transcription factor Ap2delta associates with Ash2l and ALR, a trithorax family histone methyltransferase, to activate Hoxc8 transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7472-7477.
- Taranenko, N. I., Tang, K., Allman, S. L., Ch'ang, L. Y., and Chen, C. H. (1994). 3-Aminopicolinic acid as a matrix for laser desorption mass spectrometry of biopolymers. *Rapid Commun Mass Spectrom* 8, 1001-1006.
- Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., and Leder, P. (1982). Translocation of the *c-myc* gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7837-7841.
- Terranova, R., Agherbi, H., Boned, A., Meresse, S., and Djabali, M. (2006). Histone and DNA methylation defects at Hox genes in mice expressing a SET domain-truncated form of Mll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6629-6634.
- Thomas, M., Gessner, A., Vornlocher, H. P., Hadwiger, P., Greil, J., and Heidenreich, O. (2005). Targeting MLL-AF4 with short interfering RNAs inhibits clonogenicity and engraftment of t(4;11)-positive human leukemic cells. *Blood* 106, 3559-3566.
- Tkachuk, D. C., Kohler, S., and Cleary, M. L. (1992). Involvement of a homolog of *Drosophila trithorax* by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* 71, 691-700.
- Tovey, E. R., and Baldo, B. A. (1987). Comparison of semi-dry and conventional tank-buffer electrotransfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose membranes. *Electrophoresis* 8, 384-387.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G., and Reuter, G. (1994). The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *Embo J* 13, 3822-3831.
- Tyagi, S., Chabes, A. L., Wysocka, J., and Herr, W. (2007). E2F activation of S phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases. *Mol Cell* 27, 107-119.

- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., *et al.* (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *403*, 623-627.
- Urbas, L., Brne, P., Gabor, B., Barut, M., Strlic, M., Petric, T. C., and Strancar, A. (2008). Depletion of high-abundance proteins from human plasma using a combination of an affinity and pseudo-affinity column. *J Chromatogr A*.
- Valdez, B. C., Perlaky, L., Henning, D., Saijo, Y., Chan, P. K., and Busch, H. (1994). Identification of the nuclear and nucleolar localization signals of the protein p120. Interaction with translocation protein B23. *J Biol Chem* *269*, 23776-23783.
- Van den Berghe, H., David, G., Broeckert-Van Orshoven, A., Louwagie, A., Verwilghen, R., Casteels-Van Daele, M., Eggermont, E., and Eeckels, R. (1979). A new chromosome anomaly in acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Hum Genet* *46*, 173-180.
- van Lohuizen, M., Tijms, M., Voncken, J. W., Schumacher, A., Magnuson, T., and Wientjens, E. (1998). Interaction of mouse polycomb-group (Pc-G) proteins Enx1 and Enx2 with Eed: indication for separate Pc-G complexes. *Mol Cell Biol* *18*, 3572-3579.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* *291*, 1304-1351.
- von Bergh, A. R., Beverloo, H. B., Rombout, P., van Wering, E. R., van Weel, M. H., Beverstock, G. C., Kluin, P. M., Slater, R. M., and Schuurin, E. (2002). LAF4, an AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* *35*, 92-96.
- Vorm, O., Roepstorff, P., and Mann, M. (1994). Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation. *Anal Chem* *66*, 3281-3287.
- Wang, D., Westerheide, S. D., Hanson, J. L., and Baldwin, A. S., Jr. (2000). Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J Biol Chem* *275*, 32592-32597.
- Wang, W., Budhu, A., Forgues, M., and Wang, X. W. (2005). Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat Cell Biol* *7*, 823-830.
- Wang, Y., and Belloch, R. (2009). Cell cycle regulation by MicroRNAs in embryonic stem cells. *Cancer Res* *69*, 4093-4096.
- Wei, P., Garber, M. E., Fang, S. M., Fischer, W. H., and Jones, K. A. (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* *92*, 451-462.
- Wilkins, M. R., Pasquali, C., Appel, R. D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J. C., Yan, J. X., Gooley, A. A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., *et al.* (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)* *14*, 61-65.
- Wu, C. C., MacCoss, M. J., Howell, K. E., and Yates, J. R., 3rd (2003). A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins. *Nat Biotechnol* *21*, 532-538.
- Wu, C. C., and Yates, J. R., 3rd (2003). The application of mass spectrometry to membrane proteomics. *Nat Biotechnol* *21*, 262-267.
- Wu, S. Y., and Chiang, C. M. (2007). The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. *J Biol Chem* *282*, 13141-13145.
- Wu, X., and Hua, X. (2008). Menin, histone h3 methyltransferases, and regulation of cell proliferation: current knowledge and perspective. *Curr Mol Med* *8*, 805-815.
- Wysocka, J., Myers, M. P., Laherty, C. D., Eisenman, R. N., and Herr, W. (2003). Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. *Genes Dev* *17*, 896-911.

- Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T. A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A. L., Roeder, R. G., Brivanlou, A. H., and Allis, C. D. (2005). WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* *121*, 859-872.
- Xia, Z. B., Anderson, M., Diaz, M. O., and Zeleznik-Le, N. J. (2003). MLL repression domain interacts with histone deacetylases, the polycomb group proteins HPC2 and BMI-1, and the corepressor C-terminal-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 8342-8347.
- Xia, Z. B., Popovic, R., Chen, J., Theisler, C., Stuart, T., Santillan, D. A., Erfurth, F., Diaz, M. O., and Zeleznik-Le, N. J. (2005). The MLL fusion gene, MLL-AF4, regulates cyclin-dependent kinase inhibitor CDKN1B (p27kip1) expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 14028-14033.
- Yagi, H., Deguchi, K., Aono, A., Tani, Y., Kishimoto, T., and Komori, T. (1998). Growth disturbance in fetal liver hematopoiesis of Mll-mutant mice. *Blood* *92*, 108-117.
- Yang, Z., He, N., and Zhou, Q. (2008). Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression. *Mol Cell Biol* *28*, 967-976.
- Yang, Z., Yik, J. H., Chen, R., He, N., Jang, M. K., Ozato, K., and Zhou, Q. (2005). Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Mol Cell* *19*, 535-545.
- Yik, J. H., Chen, R., Nishimura, R., Jennings, J. L., Link, A. J., and Zhou, Q. (2003). Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Mol Cell* *12*, 971-982.
- Yokoyama, A., Kitabayashi, I., Ayton, P. M., Cleary, M. L., and Ohki, M. (2002). Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties. *Blood* *100*, 3710-3718.
- Yokoyama, A., Wang, Z., Wysocka, J., Sanyal, M., Aufiero, D. J., Kitabayashi, I., Herr, W., and Cleary, M. L. (2004). Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol* *24*, 5639-5649.
- Yoneda-Kato, N., Look, A. T., Kirstein, M. N., Valentine, M. B., Raimondi, S. C., Cohen, K. J., Carroll, A. J., and Morris, S. W. (1996). The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene* *12*, 265-275.
- Yu, B. D., Hanson, R. D., Hess, J. L., Horning, S. E., and Korsmeyer, S. J. (1998). MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 10632-10636.
- Yu, B. D., Hess, J. L., Horning, S. E., Brown, G. A., and Korsmeyer, S. J. (1995). Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* *378*, 505-508.
- Zeisig, B. B., Milne, T., Garcia-Cuellar, M. P., Schreiner, S., Martin, M. E., Fuchs, U., Borkhardt, A., Chanda, S. K., Walker, J., Soden, R., *et al.* (2004). Hoxa9 and Meis1 are key targets for MLL-ENL-mediated cellular immortalization. *Mol Cell Biol* *24*, 617-628.
- Zeisig, D. T., Bittner, C. B., Zeisig, B. B., Garcia-Cuellar, M. P., Hess, J. L., and Slany, R. K. (2005). The eleven-nineteen-leukemia protein ENL connects nuclear MLL fusion partners with chromatin. *Oncogene* *24*, 5525-5532.
- Zeleznik-Le, N. J., Harden, A. M., and Rowley, J. D. (1994). 11q23 translocations split the "AT-hook" cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 10610-10614.
- Zeng, L., and Zhou, M. M. (2002). Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* *513*, 124-128.
- Zhang, Y., and Rowley, J. D. (2006). Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia. *DNA Repair (Amst)* *5*, 1282-1297.

- Zhong, H., SuYang, H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Ghosh, S. (1997). The transcriptional activity of NF-kappaB is regulated by the IkappaB-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* 89, 413-424.
- Zhong, H., Voll, R. E., and Ghosh, S. (1998). Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* 1, 661-671.
- Zhou, Q., and Yik, J. H. (2006). The Yin and Yang of P-TEFb regulation: implications for human immunodeficiency virus gene expression and global control of cell growth and differentiation. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 646-659.
- Ziemin-van der Poel, S., McCabe, N. R., Gill, H. J., Espinosa, R., III, Patel, Y., Harden, A., Rubinelli, P., Smith, S. D., LeBeau, M. M., Rowley, J. D., and et al. (1991). Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10735-10739.

8 Abkürzungsverzeichnis

%(v/v)	Volumenprozent
%(w/v)	Gewichts/Massenprozent
°C	Grad Celcius
³ H-SAM	S-(5'-Adenosyl)-L-methionin-(methyl- ³ H)
ACN	Acetonitril
AF4	<i>ALL-1 Fused gene from chromosome 4</i>
AF5q31	<i>ALL1-fused gene from chromosome 5q31</i>
AF9	<i>ALL1 fused gene from chromosome 9 protein,</i>
ALF	AF4, LAF4, FMR2
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
APOD	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure(n)
ASH2L	<i>Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit ASH2</i>
BCL6	B-cell lymphoma 6 protein
BCoR	BCL6 Co-Repressor
bcr	<i>breakpoint cluster region</i>
BD	Bromodomäne
Bisacrylamid	N,N'-Methylenbisacrylamid
b	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin</i>
CBP	CREB-Binding Protein
CCNT1	CyclinT1
CDK9	Cyclin-abhängige Kinase 9
cDNA	complementary DNA
CHD	C-terminale Homologie-Domäne
CID	<i>Collision induced dissociation</i>
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CREB	<i>Cyclic AMP Response Element-Binding Protein</i>
CS	<i>Cleavage Site</i>
CTD	C-terminale Domäne
CTD	C-terminale Domäne
DDX6	<i>Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 oder auch DEAD</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat

DOT1L	Histone H3-K79 Methyltransferase
DPY-30	Protein dpy-30 Homolog
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E_{kin}	Kinetische Energie [Einheit: 1 Joule; 1 J = kg*m ² *s ⁻²]
ENL	YEATS domain-containing protein 1
FA	<i>formic acid</i> (Ameisensäure)
FAB	<i>French-American-British Working Group for Leukemia</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FEL	<i>Four Eleven Leukemia</i>
FMR2	<i>Fragile X mental retardation 2 protein</i>
FYRC	Phenylalanin Tyrosin reiche Region in MLL_C
FYRN	Phenylalanin Tyrosin reiche Region in MLL_N
g	Gramm/Erdbeschleunigung
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
H3K4	Lysin 4 vom Histon 3
H3K79	Lysin 79 vom Histon 3
HCCA	alpha-Cyano-4-Hydroxymizimtsäure
HCF	<i>Host Cell Factor</i>
HCl	Salzsäure
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEXIM1	<i>Hexamethylene bis-acetamide-inducible protein 1</i>
HMT	Histonmethyltransferase
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IgH	<i>Immunglobulin Heavy chain</i>
IPTG	Isopropyl--thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LC	Flüssigkeitschromatographie (<i>Liquid chromatography</i>)
LDI-PCR	Long-Distance Inverse PCR
M	Molar
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
mA	Milli-Ampère
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>

MDa	Megadalton
MEF	<i>murine embryonic fibroblasts</i>
MEN-1	<i>Multiple Endocrine Neoplasia type-1</i>
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
min	Minute(n)
miRNA	micro RNA
ml	Milliliter
MLL	<i>Mixed Lineage/Myeloid Lymphoid Leukemia</i>
mM	Millimolar
MOF	<i>Probable histone acetyltransferase MYST1</i>
ms	Millisekunde
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem- bzw. Hybridmassenspektrometrie
MT-Domäne	Methyltransferase-Homologie-Domäne
MW	<i>Molecular Weight</i>
NCoR	<i>Nuclear receptor corepressor</i>
Neo	Neomycin
NFκB1/RELA	<i>Nuclear factor NF-kappa-B p65 subunit</i>
ng	Nanogramm
NHD	N-terminale Homologie-Domäne
NK	Negativkontrolle
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NPM	Nucleophosmin oder auch <i>Nucleolar phosphoprotein B23</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAGE	Poly-Acrylamid Gel-Elektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC3	Polycomb 3 Homolog
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
PHD	<i>Plant Homeo Domain</i>
pI	Isoelektrischer Punkt
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint(ing)</i>
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	<i>parts per million</i>
PRMTs	<i>protein arginine N-methyltransferases</i>
pSer	Serin-reiche Region
P-TEFb	<i>Positive Transcription Elongation Factor b</i>

PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Auflösung
RbBP5	<i>Retinoblastoma-binding protein 5</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium (Sodium)-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	1D-Polyacrylamidgelelektrophorese
SET	<i>Suppressor of variegation, Enhancer of zeste, Trithorax</i>
SIAH1	<i>E3 ubiquitin-protein ligase SLAH1 (Seven in absentia homolog 1)</i>
SIAH2	<i>E3 ubiquitin-protein ligase SLAH2 (Seven in absentia homolog 2)</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNL	<i>Speckled Nuclear Localization</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
t	Zeit
TAD	Transaktivierungsdomäne
t-ALL	Therapie-induzierte ALL
t-AML	Therapie-induzierte AML
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'- Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Flugzeitmassenanalysator (<i>Time of Flight</i>)
TOF/TOF	Tandemmassenspektrometrie
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	(p-tert-Octylphenoxy) polyethoxyethanol
Tween-20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
v	Geschwindigkeit
WDR5	<i>WD repeat-containing protein 5</i>
wt	Wildtyp
YAC	<i>Yeast Artificial Chromosom</i>
z	Ladung
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

9 Anhang

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

Tabelle 9-1: Liste aller identifizierten Proteine aus den AF4-nLC-MALDI-MS/MS Experimenten.

Detaillierte Beschreibungen der einzelnen Proteine können mittels der Protein-Abkürzung über www.expasy.org erhalten werden. Die eingestellten Suchparameter können dem Kapitel 6.6.6 entnommen werden. Die Proteine des AF4-Komplexes sind grau unterlegt.

Treffer-Nr.	Protein-Abkürzung [SwissProt]	Protein Beschreibung/ Bezeichnung	Peptide Σ	Protein-Masse [Da]	Protein-pI
1	AFF1_HUMAN	AF4/FMR2 family member 1 (Protein AF-4)	106	132139	9,26
2	HSP71_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1	49	70280	5,48
3	HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein	36	71082	5,37
4	HSP76_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 6	32	71440	5,81
5	GRP78_HUMAN	78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP 78)	31	72402	5,07
6	HS90B_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 84) (HSP 90)	26	83554	4,97
7	TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain (Tubulin beta-5 chain)	25	50095	4,78
8	TBB2C_HUMAN	Tubulin beta-2C chain (Tubulin beta-2 chain)	23	50255	4,79
9	HS90A_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86)	22	85006	4,94
10	ENL_HUMAN	Protein ENL (YEATS domain-containing protein 1)	22	62417	8,75
11	TBAK_HUMAN	Tubulin alpha-ubiquitous chain	21	50804	4,94
12	HS70L_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1L	20	70730	5,76
13	TBB2A_HUMAN	Tubulin beta-2A chain - Homo sapiens (Human)	20	50274	4,78
14	TBA3_HUMAN	Tubulin alpha-3 chain (Alpha-tubulin 3)	20	50788	4,94
15	TBA6_HUMAN	Tubulin alpha-6 chain (Alpha-tubulin 6)	19	50548	4,96
16	EF2_HUMAN	Elongation factor 2 (EF-2)	19	96246	6,41
17	TBB4_HUMAN	Tubulin beta-4 chain (Tubulin 5 beta)	18	50010	4,78
18	TBA2_HUMAN	Tubulin alpha-2 chain (Alpha-tubulin 2)	15	50612	4,97
19	GRP75_HUMAN	Stress-70 protein, mitochondrial precursor	14	73920	5,87
20	ATX2L_HUMAN	Ataxin-2-like protein (Ataxin-2 domain protein)	14	113589	8,7
21	HS105_HUMAN	Heat-shock protein 105 kDa (Heat shock 110 kDa protein)	14	97716	5,28
22	FAS_HUMAN	Fatty acid synthase	14	275850	5,99
23	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	13	42052	5,29
24	CDK9_HUMAN	Cell division protein kinase 9	12	43149	8,97
25	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin-1)	11	66149	8,16
26	PYC_HUMAN	Pyruvate carboxylase, mitochondrial precursor	11	130293	6,37
27	CCNT1_HUMAN	Cyclin-T1 (CycT1) (Cyclin-T)	11	81034	8,9
28	ENOA_HUMAN	Alpha-enolase	10	47481	7,01
29	ATPB_HUMAN	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor	10	56525	5,26
30	EF1G_HUMAN	Elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma)	10	50429	6,25
31	VIME_HUMAN	Vimentin	10	53676	5,06
32	PGRC1_HUMAN	Membrane-associated progesterone receptor component 1	9	21772	4,56
33	DDX6_HUMAN	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	9	54781	8,85
34	IMA4_HUMAN	Importin alpha-4 subunit	9	58364	4,8
35	COA1_HUMAN	Acetyl-CoA carboxylase 1	9	267095	5,95
36	ACTC_HUMAN	Actin, alpha cardiac muscle 1	8	42334	5,23
37	CH60_HUMAN	60 kDa heat shock protein (Hsp60)	8	61187	5,7
38	G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	8	36201	8,57
39	CALX_HUMAN	Calnexin precursor	8	67982	4,47
40	TPIS_HUMAN	Triosephosphate isomerase	8	26938	6,45

41	EF1A1_HUMAN	Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1)	8	50451	9,1
42	ACLY_HUMAN	ATP-citrate synthase	8	121674	6,95
43	TCPB_HUMAN	T-complex protein 1 subunit beta	7	57794	6,01
44	IMA2_HUMAN	Importin alpha-2 subunit (Karyopherin alpha-2 subunit)	7	58168	5,25
45	4F2_HUMAN	4F2 cell-surface antigen heavy chain (4F2hc)	7	58023	5,2
46	TCPA_HUMAN	T-complex protein 1 subunit alpha (TCP-1-alpha)	7	60819	5,8
47	AFF4_HUMAN	AF4/FMR2 family member 4	7	127781	9,33
48	IMA3_HUMAN	Importin alpha-3 subunit	7	58288	4,8
49	K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9 (Cytokeratin-9)	6	62320	5,19
50	NPM_HUMAN	Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23)	6	32726	4,64
51	TCPH_HUMAN	T-complex protein 1 subunit eta (TCP-1-eta)	6	59842	7,55
52	TCPG_HUMAN	T-complex protein 1 subunit gamma (TCP-1-gamma)	6	61066	6,1
53	K1C10_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 10 (Cytokeratin-10)	6	59711	5,13
54	ROA1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	5	38936	9,26
55	RBM25_HUMAN	Probable RNA-binding protein 25	5	94407	5,97
56	PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	5	18229	7,68
57	TCPE_HUMAN	T-complex protein 1 subunit epsilon (TCP-1-epsilon)	5	60089	5,45
58	KPYM_HUMAN	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	5	58470	7,96
59	NDKB_HUMAN	Nucleoside diphosphate kinase B	5	17401	8,52
60	HSP74_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 4	5	95096	5,18
61	RL15_HUMAN	60S ribosomal protein L15 - Homo sapiens (Human)	5	24245	11,62
62	PRP40_HUMAN	Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A	5	109022	7,18
63	PRDX1_HUMAN	Peroxiredoxin-1	5	22324	8,27
64	PGAM1_HUMAN	Phosphoglycerate mutase 1	5	28900	6,67
65	COF1_HUMAN	Cofilin-1	5	18719	8,22
66	CLH1_HUMAN	Clathrin heavy chain 1 (CLH-17)	5	193260	5,48
67	PIMT_HUMAN	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	5	24806	6,7
68	SYEP_HUMAN	Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase	5	164520	7,77
69	EF1D_HUMAN	Elongation factor 1-delta (EF-1-delta)	5	31217	4,9
70	K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	5	66110	8,07
71	IF39_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 9	5	92833	4,89
72	ATPA_HUMAN	ATP synthase subunit alpha	4	59828	9,16
73	SF3A1_HUMAN	Splicing factor 3 subunit 1	4	88888	5,15
74	HNRH1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	4	49484	5,89
75	GDIB_HUMAN	Rab GDP dissociation inhibitor beta	4	51087	6,11
76	YBOX1_HUMAN	Nuclease sensitive element-binding protein 1	4	35903	9,87
77	TERA_HUMAN	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	4	89950	5,14
78	ROA2_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	4	37464	8,97
79	ALDOA_HUMAN	Fructose-bisphosphate aldolase A	4	39851	8,3
80	ADT2_HUMAN	ADP/ATP translocase 2	4	33102	9,76
81	HNRPK_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	4	51230	5,39
82	IF3A_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 10	4	166867	6,38
83	MDHM_HUMAN	Malate dehydrogenase	4	35965	8,92
84	K2C5_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 5	4	62637	8,14
85	HORN_HUMAN	Hornerin	4	283140	10,05
86	AT1A1_HUMAN	Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-1 chain precursor	4	114135	5,33
87	RS4X_HUMAN	40S ribosomal protein S4, X isoform	4	29807	10,16
88	IMA1_HUMAN	Importin alpha-1 subunit	4	60952	4,94
89	IMA7_HUMAN	Importin alpha-7 subunit	4	60733	4,89
90	IMB1_HUMAN	Importin beta-1 subunit	3	98420	4,68
91	TCPD_HUMAN	T-complex protein 1 subunit delta	3	58401	7,96
92	CAH2_HUMAN	Carbonic anhydrase 2	3	29285	6,87
93	GDIA_HUMAN	Rab GDP dissociation inhibitor alpha	3	51177	5
94	CH10_HUMAN	10 kDa heat shock protein, mitochondrial (Hsp10)	3	10925	8,89
95	HNRPF_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	3	45985	5,38

96	PRDX2_HUMAN	Peroxiredoxin-2	3	22049	5,66
97	NDKA_HUMAN	Nucleoside diphosphate kinase A	3	17309	5,83
98	UBE1_HUMAN	Ubiquitin-activating enzyme E1	3	118858	5,49
99	EFTU_HUMAN	Elongation factor Tu	3	49852	7,26
100	CALR_HUMAN	Calreticulin precursor (CRP55)	3	48283	4,29
101	MOES_HUMAN	Moesin (Membrane-organizing extension spike protein)	3	67892	6,08
102	U5S1_HUMAN	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	3	110336	4,84
103	K2C6A_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6A	3	60293	8,09
104	PGK1_HUMAN	Phosphoglycerate kinase 1	3	44985	8,3
105	PDIA3_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	3	57146	5,98
106	RS19_HUMAN	40S ribosomal protein S19	3	16051	10,31
107	PUR6_HUMAN	Multifunctional protein ADE2	3	47790	6,95
108	SF3A2_HUMAN	Splicing factor 3A subunit 2	3	49338	9,65
109	MYH9_HUMAN	Myosin-9 (Myosin heavy chain 9)	3	227646	5,5
110	RBBP7_HUMAN	Histone-binding protein RBBP7	3	48132	4,89
111	KAD2_HUMAN	Adenylate kinase isoenzyme 2, mitochondrial	3	26689	7,67
112	SMC4_HUMAN	Structural maintenance of chromosomes protein 4	3	147775	6,37
113	HS74L_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 4L	3	95453	5,63
114	HNRPU_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	3	91164	5,76
115	SYIC_HUMAN	Isoleucyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	3	146178	5,86
116	PRDX6_HUMAN	Peroxiredoxin-6	2	25133	6
117	TCPZ_HUMAN	T-complex protein 1 subunit zeta	2	58444	6,23
118	CNBP_HUMAN	Cellular nucleic acid-binding protein (CNBP)	2	20704	8
119	GSTP1_HUMAN	Glutathione S-transferase P	2	23569	5,43
120	DNJA1_HUMAN	DnaJ homolog subfamily A member 1	2	45581	6,65
121	KCRB_HUMAN	Creatine kinase B-type	2	42902	5,34
122	IF5A1_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	2	17049	5,08
123	RAB10_HUMAN	Ras-related protein Rab-10	2	22755	8,59
124	PP2CG_HUMAN	Protein phosphatase 2C isoform gamma	2	59919	4,28
125	RL6_HUMAN	60S ribosomal protein L6	2	32765	10,59
126	RAP1A_HUMAN	Ras-related protein Rap-1A precursor	2	21316	6,38
127	SF3A3_HUMAN	Splicing factor 3A subunit 3	2	59154	5,27
128	CALM_HUMAN	Calmodulin (CaM)	2	16827	4,09
129	KU70_HUMAN	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1	2	70084	6,23
130	RIB1_HUMAN	Ribophorin I (RPN-I)	2	68641	5,96
131	TOM70_HUMAN	Mitochondrial precursor proteins import receptor	2	68096	6,75
132	SFPQ_HUMAN	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	2	76216	9,45
133	RAN_HUMAN	GTP-binding nuclear protein Ran	2	24579	7,01
134	KINH_HUMAN	Kinesin heavy chain (Ubiquitous kinesin heavy chain)	2	110358	6,12
135	RS18_HUMAN	40S ribosomal protein S18	2	17708	10,99
136	TRAP1_HUMAN	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial precursor	2	80345	8,3
137	HMGB1_HUMAN	High mobility group protein B1	2	25049	5,62
138	LDHB_HUMAN	L-lactate dehydrogenase B chain	2	36900	5,71
139	MPCP_HUMAN	Phosphate carrier protein, mitochondrial precursor	2	40525	9,45
140	C1QBP_HUMAN	Complement component 1 Q subcomponent-binding protein	2	31742	4,74
141	IF3I_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6	2	66912	5,93
142	NP1L1_HUMAN	Nucleosome assembly protein 1-like 1	2	45631	4,36
143	MIF_HUMAN	Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	2	12639	7,74
144	IF4A1_HUMAN	Eukaryotic initiation factor 4A-I	2	46353	5,32
145	PHB2_HUMAN	Prohibitin-2 (B-cell receptor-associated protein BAP37)	2	33276	9,83
146	SERPH_HUMAN	Serpin H1 precursor (Collagen-binding protein)	2	46525	8,75
147	MLRM_HUMAN	Myosin regulatory light chain 2, nonsarcomeric	2	19839	4,67
148	SYRC_HUMAN	Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	2	76129	6,26
149	PDIA1_HUMAN	Protein disulfide-isomerase precursor	2	57480	4,76
150	HMOX1_HUMAN	Heme oxygenase 1	2	32798	7,88

151	RAB7_HUMAN	Ras-related protein Rab-7	2	23760	6,4
152	K2C4_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 4	2	57649	6,25
153	TKT_HUMAN	Transketolase	2	68519	7,58
154	RBBP4_HUMAN	Histone-binding protein RBBP4	2	47911	4,74
155	LDHA_HUMAN	L-lactate dehydrogenase A chain	2	36950	8,44
156	ENPL_HUMAN	Endoplasmin precursor	2	92696	4,76
157	APT_HUMAN	Adenine phosphoribosyltransferase	2	19766	5,78
158	ACTN1_HUMAN	Alpha-actinin-1	2	103563	5,25
159	SODC_HUMAN	Superoxide dismutase	2	16154	5,7
160	AT1A3_HUMAN	Sodium/potassium-transporting ATPase alpha-3 chain	2	113102	5,22
161	PYR1_HUMAN	CAD protein	2	245167	6,02
162	PCCB_HUMAN	Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial precursor	2	58806	7,56
163	PAIRB_HUMAN	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	2	44995	8,66
164	ACTZ_HUMAN	Alpha-centractin (Centractin)	2	42701	6,19
165	DYHC_HUMAN	Dynein heavy chain, cytosolic (DYHC)	2	534809	6,01
166	MYL6_HUMAN	Myosin light polypeptide 6	2	17090	4,56
167	UBIQ_HUMAN	Ubiquitin	2	8560	6,56
168	PRPS1_HUMAN	Ribose-phosphate pyrophosphokinase I	2	35325	6,51
169	RSSA_HUMAN	40S ribosomal protein SA (p40) (34/67 kDa laminin receptor)	2	32947	4,79
170	ROAA_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	2	36704	9,04
171	RS10_HUMAN	40S ribosomal protein S10	2	18886	10,15
172	PCBP1_HUMAN	Poly(rC)-binding protein 1	2	37987	6,66
173	MYH10_HUMAN	Myosin-10 (Myosin heavy chain 10)	2	229824	5,44
174	EF1B_HUMAN	Elongation factor 1-beta	2	24919	4,5
175	OST48_HUMAN	Oligosaccharyl transferase 48 kDa subunit	2	48893	5,43
176	APEX1_HUMAN	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase	2	35931	8,33
177	RCN2_HUMAN	Reticulocalbin-2 precursor	2	36911	4,26
178	NUP50_HUMAN	Nucleoporin 50 kDa	2	50512	6,64
179	FLNA_HUMAN	Filamin-A (Alpha-filamin) (Filamin-1)	2	283301	5,7
180	GCSH_HUMAN	Glycine cleavage system H protein	2	19127	4,91
181	IF34_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 4	2	35874	5,87
182	SRP68_HUMAN	Signal recognition particle 68 kDa protein	2	71199	8,75
183	TXND5_HUMAN	Thioredoxin domain-containing protein 5 precursor	2	48283	5,63
184	RS20_HUMAN	40S ribosomal protein S20	2	13478	9,95
185	CSK2B_HUMAN	Casein kinase II subunit beta (CK II beta)	2	25268	5,33
186	KV206_HUMAN	Ig kappa chain V-II region RPMI 6410 precursor	1	14811	9,34
187	ROA3_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	1	39799	9,1
188	TCPQ_HUMAN	T-complex protein 1 subunit theta (TCP-1-theta)	1	60153	5,42
189	SERA_HUMAN	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	1	57356	6,29
190	VINC_HUMAN	Vinculin (Metavinculin)	1	124292	5,5
191	NEDD8_HUMAN	NEDD8 precursor (Ubiquitin-like protein Nedd8)	1	9066	7,98
192	ANXA5_HUMAN	Annexin A5 (Annexin V) (Lipocortin V)	1	35971	4,94
193	PSMD1_HUMAN	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1	1	106795	5,25
194	RLA1_HUMAN	60S acidic ribosomal protein P1	1	11621	4,26
195	SSB_HUMAN	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial precursor	1	17249	9,59
196	IPO4_HUMAN	Importin-4 (Importin 4b) (Imp4b) (Ran-binding protein 4)	1	120181	4,88
197	DDB1_HUMAN	DNA damage-binding protein 1	1	128142	5,14
198	PSMD2_HUMAN	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	1	100877	5,08
199	AAAT_HUMAN	Neutral amino acid transporter B(0) (ATB(0))	1	57018	5,34
200	G6PI_HUMAN	Glucose-6-phosphate isomerase	1	63335	8,43
201	ARP3_HUMAN	Actin-like protein 3 (Actin-related protein 3)	1	47797	5,61
202	IPYR_HUMAN	Inorganic pyrophosphatase	1	33095	5,54
203	NOLC1_HUMAN	Nucleolar phosphoprotein p130 (Nucleolar 130 kDa protein)	1	73677	9,48
204	HMGB2_HUMAN	High mobility group protein B2	1	24190	7,62
205	PYRG1_HUMAN	CTP synthase 1	1	67332	6,02

206	PSME2_HUMAN	Proteasome activator complex subunit 2	1	27515	5,44
207	PGRC2_HUMAN	Membrane-associated progesterone receptor component 2	1	23861	4,76
208	NP1L4_HUMAN	Nucleosome assembly protein 1-like 4	1	42968	4,6
209	RS24_HUMAN	40S ribosomal protein S24	1	15413	10,79
210	FUS_HUMAN	RNA-binding protein FUS	1	53622	9,4
211	LA_HUMAN	Lupus La protein	1	46979	6,68
212	TBCA_HUMAN	Tubulin-specific chaperone A	1	12904	5,25
213	IF35_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 5	1	37654	5,24
214	TEBP_HUMAN	Prostaglandin E synthase 3	1	18971	4,35
215	API5_HUMAN	Apoptosis inhibitor 5 (API-5)	1	57867	5,84
216	AN32A_HUMAN	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A	1	28682	3,99
217	HMGB3_HUMAN	High mobility group protein B3	1	23137	8,48
218	AKA12_HUMAN	A-kinase anchor protein 12	1	191895	4,38
219	IF36_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6	1	52587	5,71
220	IPO7_HUMAN	Importin-7 (Imp7) (Ran-binding protein 7)	1	120751	4,7
221	RS29_HUMAN	40S ribosomal protein S29	1	6900	10,17
222	BASI_HUMAN	Basigin precursor (Leukocyte activation antigen M6)	1	42573	5,39
223	SEPT2_HUMAN	Septin-2 (Protein NEDD5)	1	41689	6,15
224	DAZP1_HUMAN	DAZ-associated protein 1	1	43584	8,73
225	SSRD_HUMAN	Translocon-associated protein subunit delta precursor	1	19158	5,76
226	SYAC_HUMAN	Alanyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	1	107484	5,34
227	GCN1L_HUMAN	GCN1-like protein 1	1	294953	7,19
228	THIO_HUMAN	Thioredoxin (Trx) (ATL-derived factor) (ADF)	1	12015	4,82
229	DHSA_HUMAN	Succinate dehydrogenase	1	73672	7,06
230	RAB6B_HUMAN	Ras-related protein Rab-6B	1	23561	5,41
231	DDX21_HUMAN	Nucleolar RNA helicase 2	1	87804	9,32
232	GPSN2_HUMAN	Synaptic glycoprotein SC2	1	36410	9,5
233	EWS_HUMAN	RNA-binding protein EWS	1	68721	9,37
234	RS5_HUMAN	40S ribosomal protein S5	1	23033	9,73
235	SURF4_HUMAN	Surfeit locus protein 4	1	30602	7,64
236	ECHM_HUMAN	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor	1	31823	8,34
237	RS28_HUMAN	40S ribosomal protein S28	1	7893	10,7
238	PRS6B_HUMAN	26S protease regulatory subunit 6B	1	47451	5,09
239	SAP_HUMAN	Proactivator polypeptide precursor	1	59899	5,06
240	P5CS_HUMAN	Delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	1	87989	6,66
241	K2C7_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 7	1	51443	5,5
242	K0310_HUMAN	Uncharacterized protein KIAA0310	1	234855	5,4
243	ERP29_HUMAN	Endoplasmic reticulum protein ERp29 precursor	1	29032	6,77
244	TXLNA_HUMAN	Alpha-taxilin	1	62195	6,15
245	DDX3X_HUMAN	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	1	73597	6,73
246	PYGL_HUMAN	Glycogen phosphorylase, liver form	1	97486	6,71
247	RANG_HUMAN	Ran-specific GTPase-activating protein (Ran-binding protein 1)	1	23467	5,19
248	RENT2_HUMAN	Regulator of nonsense transcripts 2	1	148972	5,5
249	RLA2_HUMAN	60S acidic ribosomal protein P2	1	11658	4,42
250	PSD7_HUMAN	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 7	1	37060	6,29
251	IF4G1_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	1	176168	5,27
252	PSME3_HUMAN	Proteasome activator complex subunit 3	1	29602	5,69
253	ATPO_HUMAN	ATP synthase O subunit, mitochondrial precursor	1	23377	9,97
254	TADBP_HUMAN	TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43)	1	45053	5,85
255	ASNS_HUMAN	Asparagine synthetase	1	64899	6,39
256	ATP5J_HUMAN	ATP synthase coupling factor 6	1	12580	9,52
257	RIB2_HUMAN	Ribophorin II (RPN-II) (RIBIIR)	1	69355	5,44
258	1433Z_HUMAN	14-3-3 protein zeta/delta	1	27899	4,73
259	SET_HUMAN	Protein SET (Phosphatase 2A inhibitor I2PP2A)	1	33469	4,23
260	IMB3_HUMAN	Importin beta-3 (Karyopherin beta-3)	1	125032	4,83

261	1433E_HUMAN	14-3-3 protein epsilon	1	29326	4,63
262	NDUS8_HUMAN	NADH dehydrogenase	1	24203	6
263	CND3_HUMAN	Condensin complex subunit 3	1	115345	5,44
264	DHCA_HUMAN	Carbonyl reductase [NADPH] 1	1	30641	8,55
265	DYL1_HUMAN	Dynein light chain 1, cytoplasmic	1	10530	6,89
266	RL24_HUMAN	60S ribosomal protein L24	1	17882	11,26
267	STMN1_HUMAN	Stathmin (Phosphoprotein p19)	1	17292	5,76
268	RUVB1_HUMAN	RuvB-like 1	1	50538	6,02
269	ATPK_HUMAN	ATP synthase f chain, mitochondrial	1	11025	9,7
270	HRX_HUMAN	Zinc finger protein HRX (ALL-1)	1	436044	9,22
271	PDIA6_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A6 precursor	1	48490	4,95
272	SYV_HUMAN	Valyl-tRNA synthetase	1	141642	7,53
273	RCC2_HUMAN	Protein RCC2	1	56790	9,02
274	RM10_HUMAN	39S ribosomal protein L10, mitochondrial precursor	1	29506	9,63
275	SPEE_HUMAN	Spermidine synthase	1	34373	5,3
276	MTA2_HUMAN	Metastasis-associated protein MTA2	1	75717	9,7
277	PRS4_HUMAN	26S protease regulatory subunit 4	1	49325	5,87
278	SYTC_HUMAN	Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	1	84294	6,23
279	RL38_HUMAN	60S ribosomal protein L38	1	8270	10,1
280	PSB2_HUMAN	Proteasome subunit beta type 2	1	22993	6,51
281	KNG1_HUMAN	Kininogen-1 precursor	1	72996	6,34
282	TFR1_HUMAN	Transferrin receptor protein 1	1	85274	6,18
283	RL10A_HUMAN	60S ribosomal protein L10a	1	24987	9,94
284	H2A1A_HUMAN	Histone H2A type 1-A	1	14225	10,86
285	DPY30_HUMAN	Dpy-30-like protein	1	11243	4,84
286	PRDX3_HUMAN	Thioredoxin-dependent peroxide reductase	1	28017	7,67
287	RL12_HUMAN	60S ribosomal protein L12	1	17979	9,48
288	KLDC2_HUMAN	Kelch domain-containing protein 2	1	46697	6,13
289	DDX46_HUMAN	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	1	117803	9,33
290	SFRS3_HUMAN	Splicing factor, arginine/serine-rich 3	1	19546	11,64
291	CPNE1_HUMAN	Copine-1 (Copine I)	1	59649	5,52
292	RS27L_HUMAN	40S ribosomal protein S27-like protein	1	9813	9,57
293	UBP7_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 7	1	129274	5,33
294	C1TC_HUMAN	C-1-tetrahydrofolate synthase, cytoplasmic	1	102180	6,89
295	PSMD3_HUMAN	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	1	61054	8,47
296	RCC1_HUMAN	Regulator of chromosome condensation	1	45397	7,18
297	HDFG_HUMAN	Hepatoma-derived growth factor (HDGF)	1	26886	4,7
298	RD23B_HUMAN	UV excision repair protein RAD23 homolog B	1	43202	4,79
299	SYQ_HUMAN	Glutaminyl-tRNA synthetase	1	88655	6,71
300	RS15A_HUMAN	40S ribosomal protein S15a	1	14944	10,14
301	HXK1_HUMAN	Hexokinase-1	1	103561	6,36
302	FXR1_HUMAN	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	1	69991	5,91
303	HINT1_HUMAN	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	1	13907	6,43
304	JIP4_HUMAN	C-jun-amino-terminal kinase-interacting protein 4	1	146913	5,05
305	RS23_HUMAN	40S ribosomal protein S23	1	15969	10,5
306	G3BP2_HUMAN	Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	1	54145	5,41
307	SRP09_HUMAN	Signal recognition particle 9 kDa protein	1	10219	7,77
308	TIF1B_HUMAN	Transcription intermediary factor 1-beta (TIF1-beta)	1	90261	5,52
309	PERQ2_HUMAN	Trinucleotide repeat-containing protein 15	1	150320	5,45
310	PSMD6_HUMAN	Proteasome regulatory particle subunit p44S10	1	45787	5,45
311	PSA_HUMAN	Puromycin-sensitive aminopeptidase	1	103895	5,49
312	HCDH_HUMAN	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial precursor	1	34313	8,88
313	U520_HUMAN	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	1	246006	5,73
314	RL7A_HUMAN	60S ribosomal protein L7a	1	30148	10,61
315	GBF1_HUMAN	BFA-resistant GEF 1	1	208367	5,48

316	AMPL_HUMAN	Cytosol aminopeptidase	1	56530	8,03
317	KAP2_HUMAN	cAMP-dependent protein kinase type II-alpha regulatory subunit	1	45832	4,96
318	RL23_HUMAN	60S ribosomal protein L23	1	14970	10,51
319	IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain C region	1	36489	7,66
320	HSPB1_HUMAN	Heat-shock protein beta-1 (HspB1)	1	22826	5,98
321	RL18_HUMAN	60S ribosomal protein L18	1	21735	11,73
322	RGS3_HUMAN	Regulator of G-protein signaling 3	1	134134	5,9
323	LAMP1_HUMAN	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 precursor	1	45201	9,22
324	PHB_HUMAN	Prohibitin	1	29843	5,57
325	COTL1_HUMAN	Coactosin-like protein	1	16049	5,54
326	RL30_HUMAN	60S ribosomal protein L30	1	12947	9,65
327	TRY1_HUMAN	Trypsin-1 precursor	1	27111	6,08
328	RS7_HUMAN	40S ribosomal protein S7	1	22113	10,09
329	RL17_HUMAN	60S ribosomal protein L17 (L23)	1	21611	10,18
330	SC23A_HUMAN	Protein transport protein Sec23A	1	87004	6,64
331	LRC59_HUMAN	Leucine-rich repeat-containing protein 59	1	35308	9,61
332	SAHH_HUMAN	Adenosylhomocysteinase	1	48255	5,92
333	RS9_HUMAN	40S ribosomal protein S9	1	22635	10,66
334	SGTA_HUMAN	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein A	1	34270	4,81
335	LAP2A_HUMAN	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alpha	1	76016	7,56
336	GANAB_HUMAN	Neutral alpha-glucosidase AB precursor	1	107263	5,74
337	OXR_P_HUMAN	150 kDa oxygen-regulated protein precursor	1	111494	5,16
338	RL8_HUMAN	60S ribosomal protein L8	1	28235	11,03
339	ENAM_HUMAN	Enamelin precursor	1	129064	6,48
340	MBB1A_HUMAN	Myb-binding protein 1A	1	149731	9,34
341	YES_HUMAN	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Yes	1	61276	6,32
342	CD2L7_HUMAN	Cell division cycle 2-related protein kinase 7	1	164738	9,48
343	RS14_HUMAN	40S ribosomal protein S14 - Homo sapiens (Human)	1	16434	10,07
344	SF3B3_HUMAN	Splicing factor 3B subunit 3	1	136575	5,13
345	STT3A_HUMAN	Oligosaccharyl transferase subunit STT3A	1	80989	8,43
346	GP162_HUMAN	Probable G-protein coupled receptor 162	1	64631	8,83
347	AT2A2_HUMAN	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	1	116336	5,23
348	PCCA_HUMAN	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial precursor	1	77932	6,63
349	LPPRC_HUMAN	130 kDa leucine-rich protein (LRP 130) (GP130)	1	146306	5,5
350	ANM1_HUMAN	Protein arginine N-methyltransferase 1	1	42029	5,31
351	CF060_HUMAN	Uncharacterized protein C6orf60	1	119482	5,52
352	LAT1_HUMAN	Large neutral amino acids transporter small subunit 1	1	55659	7,9
353	LAP2B_HUMAN	Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma	1	50696	9,39
354	SND1_HUMAN	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	1	102618	6,74
355	K0146_HUMAN	Uncharacterized protein KIAA0146	1	102135	6,22
356	BTNL3_HUMAN	Butyrophilin-like protein 3 precursor	1	52816	5,84
357	LAMP2_HUMAN	Lysosome-associated membrane glycoprotein 2 precursor	1	45503	5,35
358	PROF1_HUMAN	Profilin-1 (Profilin I)	1	15216	8,44
359	CORT_HUMAN	Cortistatin precursor	1	11639	8,84
360	PUR2_HUMAN	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3	1	108953	6,26
361	PTBP1_HUMAN	Polypyrimidine tract-binding protein 1	1	57357	9,22
362	XPO5_HUMAN	Exportin-5 (Exp5) (Ran-binding protein 21)	1	138332	5,56
363	PR285_HUMAN	PPAR-alpha-interacting complex protein 285	1	298170	7,36
364	PF2D2_HUMAN	Prefoldin subunit 2	1	16695	6,2
365	PIGR_HUMAN	Polymeric-immunoglobulin receptor precursor	1	84459	5,58
366	MMP15_HUMAN	Matrix metalloproteinase-15 precursor	1	76101	7,03
367	PUR9_HUMAN	Bifunctional purine biosynthesis protein PURH	1	65089	6,27
368	ROA0_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	1	30993	9,34
369	IF4H_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 4H	1	27425	6,67
370	ENSA_HUMAN	Alpha-endosulfine (ARPP-19e)	1	13381	6,62

371	H1X_HUMAN	Histone H1x	1	22474	10,76
372	UAP56_HUMAN	Spliceosome RNA helicase BAT1	1	49416	5,44
373	MCA3_HUMAN	Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon-1	1	19855	8,54
374	PARP1_HUMAN	Poly [ADP-ribose] polymerase 1	1	113811	8,99
375	RL36_HUMAN	60S ribosomal protein L36	1	12303	11,59
376	ANM5_HUMAN	Protein arginine N-methyltransferase 5	1	73322	5,88
377	FLNB_HUMAN	Filamin-B (FLN-B) (Beta-filamin)	1	280188	5,49
378	FAK1_HUMAN	Focal adhesion kinase 1	1	119956	6,19
379	CENPU_HUMAN	Centromere protein U	1	47721	9,18
380	ZN516_HUMAN	Zinc finger protein 516	1	126321	9,02
381	GP175_HUMAN	Integral membrane protein GPR175	1	41426	5,72
382	PRKDC_HUMAN	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	1	473749	6,75
383	IF38_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8	1	105962	5,48
384	AF9_HUMAN	Protein AF-9 (ALL1 fused gene from chromosome 9 protein)	1	63671	8,77
385	GRN_HUMAN	Granulins precursor (Proepithelin) (PEPI)	1	68518	6,43
386	LRMP_HUMAN	Lymphoid-restricted membrane protein	1	62681	5,68
387	SEPT7_HUMAN	Septin-7 (CDC10 protein homolog)	1	50933	8,76
388	TM165_HUMAN	Transmembrane protein 165	1	35055	6,54
389	SUHW3_HUMAN	Suppressor of hairy wing homolog 3	1	84867	9,29
390	IF37_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7	1	64560	5,79
391	SYDC_HUMAN	Aspartyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	1	57499	6,11
392	RM27_HUMAN	Mitochondrial 39S ribosomal protein L27	1	16120	10,42
393	NHERF_HUMAN	Ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50	1	39130	5,55
394	BOLA2_HUMAN	BolA-like protein 2	1	10281	6,07
395	CCNT2_HUMAN	Cyclin-T2 (CycT2)	1	81492	9,04
396	RL3L_HUMAN	60S ribosomal protein L3-like	1	46609	10,45
397	IGF1B_HUMAN	Insulin-like growth factor IB precursor	1	22454	9,78
398	TCOF_HUMAN	Treacle protein (Treacher Collins syndrome protein)	1	152241	9,06
399	NPA1P_HUMAN	Nucleolar preribosomal-associated protein 1	1	254439	5,97
400	RAB2A_HUMAN	Ras-related protein Rab-2A	1	23702	6,08
401	UN45B_HUMAN	UNC45 homolog B	1	104979	8,03
402	LN28A_HUMAN	Lin-28 homolog A	1	23241	8,35
403	2AAA_HUMAN	PP2A, subunit A, PR65-alpha isoform	1	65980	4,96
404	GROA_HUMAN	Growth-regulated protein alpha precursor (CXCL1)	1	11522	10,46
405	RUXE_HUMAN	Small nuclear ribonucleoprotein E	1	10854	9,46
406	CG029_HUMAN	Uncharacterized protein C7orf29	1	26621	7,05
407	MSH2_HUMAN	DNA mismatch repair protein Msh2	1	105418	5,58
408	INOC1_HUMAN	Putative DNA helicase INO80 complex homolog 1	1	177556	9,53
409	CKAP4_HUMAN	Cytoskeleton-associated protein 4	1	66097	5,63
410	SFRS2_HUMAN	Splicing factor, arginine/serine-rich 2	1	25461	11,86
411	CENA1_HUMAN	Centaurin-alpha 1	1	43740	9,1

Tabelle 9-2: Liste aller identifizierten Proteine aus den der4-nLC-MALDI-MS/MS Experimenten.

Detaillierte Beschreibungen der einzelnen Proteine können mittels der Protein-Abkürzung über www.expasy.org erhalten werden. Die eingestellten Suchparameter können dem Kapitel 6.6.6 entnommen werden. Die Proteine des der4-Komplexes sind grau unterlegt.

Treffer-Nr.	Protein-Abkürzung [SwissProt]	Protein Beschreibung/ Bezeichnung	ident. Peptide	Protein-Masse [Da]	Protein-pl
1	HRX_HUMAN	Zinc finger protein HRX (ALL-1)	131	436044	9,22
2	AFF1_HUMAN	AF4/FMR2 family member 1 (Protein AF-4)	44	132139	9,26
3	HSP71_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1	38	70280	5,48
4	HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein	23	71082	5,37
5	GRP78_HUMAN	78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP 78)	22	72402	5,07
6	HCFC1_HUMAN	Host cell factor (HCF) (HCF-1)	14	210707	7,49
7	HSP76_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 6	13	71440	5,81
8	TBB5_HUMAN	Tubulin beta chain (Tubulin beta-5 chain)	11	50095	4,78
9	GRP75_HUMAN	Stress-70 protein, mitochondrial precursor	10	73920	5,87
10	TBB2C_HUMAN	Tubulin beta-2C chain (Tubulin beta-2 chain)	9	50255	4,79
11	ATX2L_HUMAN	Ataxin-2-like protein	9	113589	8,7
12	TBA6_HUMAN	Tubulin alpha-6 chain (Alpha-tubulin 6)	7	50548	4,96
13	PIMT_HUMAN	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	7	24806	6,7
14	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	6	42052	5,29
15	HS105_HUMAN	Heat-shock protein 105 kDa	6	97716	5,28
16	EF1G_HUMAN	Elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma)	5	50429	6,25
17	RBBP5_HUMAN	Retinoblastoma-binding protein 5 (RBBP-5)	4	59729	4,92
18	CH60_HUMAN	60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor	4	61187	5,7
19	WDR5_HUMAN	WD repeat protein 5 (BMP2-induced 3-kb gene protein)	4	37136	8,54
20	DDX6_HUMAN	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	4	54781	8,85
21	ASH2L_HUMAN	Set1/Ash2 histone methyltransferase complex subunit ASH2	4	69307	5,45
22	CSK21_HUMAN	Casein kinase II subunit alpha	3	45229	7,29
23	HS90A_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-alpha (HSP 86)	3	85006	4,94
24	EF1A1_HUMAN	Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1)	3	50451	9,1
25	CCNT1_HUMAN	Cyclin-T1 (CycT1) (Cyclin-T)	3	81034	8,9
26	PSME3_HUMAN	Proteasome activator complex subunit 3	3	29602	5,69
27	CSK2B_HUMAN	Casein kinase II subunit beta	2	25268	5,33
28	MIF_HUMAN	Macrophage migration inhibitory factor (MIF)	2	12639	7,74
29	HSP74_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 4	2	95096	5,18
30	ADT2_HUMAN	ADP/ATP translocase 2	2	33102	9,76
31	HS90B_HUMAN	Heat shock protein HSP 90-beta (HSP 84) (HSP 90)	2	83554	4,97
32	CDK9_HUMAN	Cell division protein kinase 9	2	43149	8,97
33	DPY30_HUMAN	Dpy-30-like protein	2	11243	4,84
34	PRDX1_HUMAN	Peroxiredoxin-1	2	22324	8,27
35	PPIA_HUMAN	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	2	18229	7,68
36	PRDX4_HUMAN	Peroxiredoxin-4	2	30749	5,86
37	MCCC2_HUMAN	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain	2	61808	7,57
38	GDE_HUMAN	Glycogen debranching enzyme (Glycogen debrancher)	2	176819	6,31
39	TCPB_HUMAN	T-complex protein 1 subunit beta (TCP-1-beta) (CCT-beta)	2	57794	6,01
40	HCFC2_HUMAN	Host cell factor 2 (HCF-2) (C2 factor)	2	87694	8,75
41	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin-1)	2	66149	8,16
42	EF2_HUMAN	Elongation factor 2 (EF-2)	1	96246	6,41
43	COA1_HUMAN	Acetyl-CoA carboxylase 1	1	267095	5,95
44	RS29_HUMAN	40S ribosomal protein S29	1	6900	10,17
45	SET_HUMAN	Protein SET (Phosphatase 2A inhibitor I2PP2A)	1	33469	4,23

46	UTS2_HUMAN	Urotensin-2 precursor (Urotensin-II)	1	14515	7,66
47	GCSH_HUMAN	Glycine cleavage system H protein	1	19127	4,91
48	ACTN1_HUMAN	Alpha-actinin-1 (Alpha-actinin cytoskeletal isoform)	1	103563	5,25
49	TCPE_HUMAN	T-complex protein 1 subunit epsilon	1	60089	5,45
50	RS9_HUMAN	40S ribosomal protein S9	1	22635	10,66
51	FAS_HUMAN	Fatty acid synthase	1	275850	5,99
52	HNRPF_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	1	45985	5,38
53	SERA_HUMAN	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	1	57356	6,29
54	ROA1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	1	38936	9,26
55	SFPQ_HUMAN	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	1	76216	9,45
56	PP2AA_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha	1	36142	5,3
57	SF3A1_HUMAN	Splicing factor 3 subunit 1	1	88888	5,15
58	TCPG_HUMAN	T-complex protein 1 subunit gamma (TCP-1-gamma)	1	61066	6,1
59	CLH1_HUMAN	Clathrin heavy chain 1 (CLH-17)	1	193260	5,48
60	SYT4_HUMAN	Synaptotagmin-4 (Synaptotagmin IV)	1	48327	8,72
61	PGAM1_HUMAN	Phosphoglycerate mutase 1	1	28900	6,67
62	CH10_HUMAN	10 kDa heat shock protein, mitochondrial (Hsp10)	1	10925	8,89
63	ASPP1_HUMAN	Apoptosis-stimulating of p53 protein 1	1	120082	6,25
64	NPM_HUMAN	Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23)	1	32726	4,64
65	PGRC1_HUMAN	Membrane-associated progesterone receptor component 1	1	21772	4,56
66	G3P_HUMAN	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1	36201	8,57
67	ANK2_HUMAN	Ankyrin-2 (Brain ankyrin) (Ankyrin-B)	1	432588	5,03
68	HS74L_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 4L	1	95453	5,63
69	SUCA_HUMAN	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha	1	35424	9,11
70	COG1_HUMAN	Conserved oligomeric Golgi complex component 1	1	110107	6,96
71	IMB1_HUMAN	Importin beta-1 subunit (Karyopherin beta-1 subunit)	1	98420	4,68
72	KCRB_HUMAN	Creatine kinase B-type	1	42902	5,34
73	L1CAM_HUMAN	Neural cell adhesion molecule L1 precursor (N-CAM L1)	1	140885	5,84
74	WASF2_HUMAN	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2	1	54478	5,38
75	K22E_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	1	66110	8,07
76	HTRA3_HUMAN	Probable serine protease HTRA3 precursor	1	49489	6,71
77	STMN1_HUMAN	Stathmin (Phosphoprotein p19) (pp19) (Oncoprotein 18)	1	17292	5,76
78	RAN_HUMAN	GTP-binding nuclear protein Ran (GTPase Ran)	1	24579	7,01
79	XYLT1_HUMAN	Xylosyltransferase 1	1	108357	9,32
80	CSK22_HUMAN	Casein kinase II subunit alpha	1	41358	8,65
81	MAGI1_HUMAN	Membrane-associated guanylate kinase	1	165510	7,3
82	SNAT_HUMAN	Serotonin N-acetyltransferase	1	23842	7,21

Tabelle 9-3: Liste aller identifizierten Proteine aus den nLC-MALDI-MS/MS Experimenten der Negativkontrolle.

Detaillierte Beschreibungen der einzelnen Proteine können mittels der Protein-Abkürzung über www.expasy.org erhalten werden. Die eingestellten Suchparameter können dem Kapitel 6.6.6 entnommen werden.

Treffer-Nr.	Protein-Abkürzung [SwissProt]	Protein Beschreibung/ Bezeichnung	ident. Peptide	Protein-Masse [Da]	Protein-pl
1	PYC_HUMAN	Pyruvate carboxylase	26	130293	6,37
2	PCCA_HUMAN	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain	24	77932	6,63
3	PCCB_HUMAN	Propionyl-CoA carboxylase beta chain	16	58806	7,56
4	MCCC2_HUMAN	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain	11	61808	7,57
5	HSP71_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1 (HSP70.1)	10	70280	5,48
6	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin-1)	8	66149	8,16
7	GRP78_HUMAN	78 kDa glucose-regulated protein precursor (GRP 78)	6	72402	5,07
8	ACTB_HUMAN	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	5	42052	5,29
9	ATX2L_HUMAN	Ataxin-2-like protein (Ataxin-2 domain protein)	4	113589	8,7
10	HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein	4	71082	5,37
11	GRP75_HUMAN	Stress-70 protein, mitochondrial precursor	4	73920	5,87
12	MCCA_HUMAN	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha	4	80935	7,66
13	K1C9_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 9	2	62320	5,19
14	EF1G_HUMAN	Elongation factor 1-gamma (EF-1-gamma)	2	50429	6,25
15	GCSH_HUMAN	Glycine cleavage system H protein	1	19127	4,91
16	PIMT_HUMAN	Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase	1	24806	6,7
17	KNG1_HUMAN	Kininogen-1 precursor (Alpha-2-thiol proteinase inhibitor)	1	72996	6,34
18	UBP35_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 35	1	114987	5,43
19	CORT_HUMAN	Cortistatin precursor	1	11639	8,84
20	K2C6A_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 6A (Cytokeratin-6A)	1	60293	8,09

9.2 Lebenslauf

Persönliche Angaben

- Name: Sabrina Baltruschat
- Geburtsdatum: 13.07.1980
- Geburtsort: Hofheim am Taunus

Schulbildung

- 1986 – 1990 Niddaschule, Frankfurt/M., Grundschule
- 1990 – 1996 Helene-Lange-Schule, Frankfurt/M., Gymnasium
- 1996 – 1999 Friedrich-Dessauer-Gymnasium, Frankfurt/M., Oberstufe
- 06/1999 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Hochschulbildung

- 10/1999 – 10/2003 Studium der Pharmazie an der Goethe Universität, Frankfurt/M.
- 11/2004 Approbation zum Apotheker

Wissenschaftlicher Werdegang

- 01/2005 Beginn der Promotion am Institut für Pharmazeutische Chemie der Goethe Universität, Frankfurt/M. unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Karas
Dissertationsthema:
Untersuchung hochmolekularer Proteinkomplexe in menschlichen Leukämien mittels Proteomics Werkzeugen

Praktische Ausbildung

- 10/2003 – 04/2004 Struwelpeter Apotheke, Frankfurt/M.
- 05/2004 – 10/2004 Merz Pharmaceuticals GmbH, Frankfurt/M.

9.3 Publikationen, Vorträge und Präsentationen

Unraveling the molecular composition of the AF4 and AF4•MLL multi-protein complex involved in transcriptional and epigenetic processes

Benedikt A., Baltruschat S., Arrey T., Meyer B., Karas M., Bursen A., Dingermann T. and Marschalek R.

Eingereicht (Publikation)

Purification of the AF4 / ENL / DOT1L multiprotein complex

Baltruschat S., Bursen A., Moritz S., Dingermann T., Karas M. & Marschalek R.

Jahrestagung der Kind-Phillip Stiftung für Leukämieforschung in Wilsede,

Juni 2006 (Vortrag)

Charakterisierung des AF4-Multiproteinkomplexes

Baltruschat S., Benedikt A., Bursen A., Arrey T., Meyer B., Marschalek R. und Karas M.

41. Diskussionstagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie (DGMS), Gießen, Deutschland, 2. bis 5. März 2008 (Posterbeitrag)

Characterization of the der4 multiprotein complex for the elucidation of its role in acute lymphoblastic leukemia (ALL)

Baltruschat S., Benedikt A., Bursen A., Arrey T., Meyer B., Marschalek R. und Karas M.

56th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topic, Denver, Colorado,

1. bis 5. Juni 2008 (Posterbeitrag)

9.4 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde als gemeinsames Projekt in den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Rolf Marschalek (Pharmazeutische Biologie) und Prof. Dr. M. Karas (Pharmazeutische Chemie) in der Zeit von Januar 2005 bis März 2009 durchgeführt.

Ein herzliches Dankeschön geht an meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Karas für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, die es mir ermöglichte das interessante Gebiet der Massenspektrometrie und der Proteomforschung näher kennenzulernen. Die hervorragenden Arbeitsbedingungen und seine Diskussionsbereitschaft bei Problemen haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die Teilnahme an nationalen und internationalen Tagungen bedanken, die neue Denkanstöße geliefert haben. Auch für die zahlreichen Grillfeiern, Weihnachtsfeiern und Seminarwochen möchte ich mich bei ihm bedanken.

Prof. Dr. Rolf Marschalek danke ich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, für seine stets offene Tür bei Problemen, die vielen Diskussionen und die schnelle Durchsicht meiner Arbeit. Vielen Dank für die gute Betreuung während dieser Arbeit, und dass ich als volles Mitglied des Arbeitskreises für Pharmazeutische Biologie angesehen wurde mit einem eigenen Laborplatz und alle Gerätschaften uneingeschränkt nutzen konnte. DANKE!

Allen jetzigen und früheren Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, Dr. Ute Bahr, Dr. Thomas Russ, Walter Eckhard, Tabiwang Arrey, Dominic Bäumlisberger, Tobias Beckhaus, Sandra Bornemann, Dr. Carsten Corvey, Dr. Marianne André Gallardo, Jeremy Hack, Dr. Martin Hampel, Tri Hoang, Dr. Sandra Hofmann, Dr. Corinna Hunger, Thorsten Jaskolla, Stavroula Markoutsas, Dr. Björn Meier, Andreas Münch, Dimitrios Papatotiriou, Markus Persike, Dr. Isam Rais, Benjamin Rietschel, Marion Rohmer, Malte Schürken, Dr. Eric Schulz, Dorota Urbanek und Markus Weidlich danke ich für die angenehme Atmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe und die vielen lustigen Stunden, die wir gemeinsam beim Mittagessen, im Labor oder bei unseren Seminarwochen in Dänemark und im Allgäu hatten!

Besonders danken möchte ich meinem Arbeitskollegen Tabi, der die zahlreichen nLC-MALDI-MS/MS-Versuche für Anne und mich durchgeführt hat. Danke für Deine Hilfsbereitschaft. Deine Messungen haben einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

Ein ganz ganz besonderer großer Dank geht an meine Freundin und Arbeitskollegin Sandra Bornemann! Vielen Dank für Dein stets offenes Ohr und Deine Geduld! Was hätte ich nur ohne Dich gemacht...☺

Ein großes Dankeschön gilt allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der pharmazeutischen Biologie: Anne Benedikt, Silvia Bracharz, Dr. Thanh Chung, Irina Eberle, Annika Heil, Julia Hofmann, Miriam Jacobi, Dr. Ingo Jennes, Dr. Eric Kowarz, Erika Lemmer, Dr. Claus Meyer, Mirko Moreno, Dr. Clarissa Oehm, Freia Pfeil, Birgit Pless, Jens Rabenstein, Samaneh Sabiani, Dr. Björn Schneider, Dr. Oliver Siol, Nadine Spilger, Ute Steiner, Hagen Witzel und Dr. Ilse Zündorf. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit und die vielen gemeinsamen netten Stunden an der Bench und im Kaffeeraum! Danke, dass ihr mich im Zuge der Kooperation so herzlich bei Euch aufgenommen habt! Ich habe mich bei Euch sehr wohl gefühlt!

Ein großes DANKE auch an die TA's Freia, Jenny und Silvia für ihre Hilfsbereitschaft im Labor!

Heidi danke ich für die vielen Diskussionen und für ihre Unterstützung während der Arbeit.

Liebe Anne, ich danke Dir für die super Zusammenarbeit im Labor! Aus den unzähligen Gesprächen – sei es beruflicher oder privater Natur – ist eine Freundschaft entstanden für die ich dankbar bin.

Ich danke Markus Heinrich aus der Arbeitsgruppe von Dr. Manuel Grez für die Durchführung der Größenausschlusschromatographie-Versuche.

Ein Dankeschön geht an Julia Herglotz aus der Arbeitsgruppe von Dr. Lausen für die Hilfe bei der Etablierung des Histonmethyltransferase-Assays in Rolfs Labor.

EIN GANZ GROSSES HERZLICHES DANKE...

gilt vorallem meinen Eltern, Stefanie, Corinna und Sebastian ☺. Sie haben mich immer unterstützt. Vielen Dank für Euren Zuspruch, Eure Geduld und Euren Humor!

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über „Untersuchung hochmolekularer Proteinkomplexe in menschlichen Leukämien mittels Proteomics Werkzeugen“ selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den

.....
Sabrina Baltruschat