

**Biochemische Charakterisierung
der Transkriptionsfaktoren
c-Myb und FOG-1**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Dipl. Chem. Kathrin Ackermann
geboren am 22. 11. 1967 in Hildesheim

Hannover 2002

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover in der Zeit vom 01. 03. 1999 bis zum 28. 05. 2002 unter der Leitung von Herrn PD Dr. H. Wolfes angefertigt.

Referent:

PD Dr. rer. nat. H. Wolfes
Abteilung Biophysikalische Chemie
Zentrum Biochemie
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent:

Prof. Dr. rer. nat. W. Müller
Abteilung Physiologische Chemie
Zentrum Biochemie
Medizinische Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 01. 07. 2002

Für meinen Vater,

für Gulla,

und für Lutz

Danksagung

Prof. Dr. J. Alves für die Möglichkeit, meine Dissertation im Institut für Biophysikalische Chemie durchführen zu können, dafür, daß ich an diesem Institut keine Spur von Konkurrenzdenken, sondern ein Gemeinschaftsgefühl erlebt und mich hier deshalb von Anfang an ausgesprochen wohl gefühlt habe – und dafür, daß er mich zu Heiner geführt hat.

Meinem Doktorvater PD Dr. H. Wolfes für die Möglichkeit, diese Dissertation unter seiner Leitung anfertigen zu können, für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die gewährte Freiheit einerseits und das immer offene Ohr bei Fragen und Problemen andererseits, für geduldiges und gründliches Korrekturlesen und für die ausgezeichneten Arbeitsessen.

Prof. Dr. W. Müller für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Dem Graduiertenkolleg „Molekulare Pathophysiologie des Zellwachstums“ für die zweijährige Finanzierung meines Projektes.

Prof. Dr. B. Lüscher für die Ko-Betreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs, für einige Anregungen und einige Plasmide sowie die Möglichkeit, den Lumaten zu benutzen.

Michael Scholz für die Einweihung in die Geheimnisse der Gentechnik und der Kultivierung eukaryontischer Zellen.

André Schürmann, Martin Haas, Michaela Siegert und Mike Stöver für die gute Zusammenarbeit, die lockere Atmosphäre und dafür, daß die Arbeit Spaß gemacht hat, auch wenn mal gar nichts klappte, meinen Großversuchspraktikanten für ihren Beitrag – und Martin Haas auch noch für das Ertragen meiner Launen und seine Hilfe gegen Ende dieser Arbeit.

Hella Scharnhorst und Claudia Thiel für ihre Kompetenz und ständige Hilfsbereitschaft, dafür, daß sie mir sehr viel beigebracht haben, aber auch für die gute Gesellschaft, die Begrüßung nicht nur unseres Büros, diverse gemeinsame Frühstücke und Mittagessen, Kochrezepte und mein gewecktes Interesse an Skandinavien.

Allen Mitarbeitern der Biophysikalischen Chemie für die gute, kollegiale Atmosphäre, die ich in diesem Institut erfahren habe, für viele nette Klön-Minuten zwischendurch und die stetige Bereitschaft, mit Rat, Tat oder Materialien auszuhelfen.

Lal Pirouzmandi für den guten Tip, mich doch mal in der MHH in dem „Gebäude hinter der Rasenfläche“ nach einer Doktorandenstelle zu erkundigen (auch wenn ich inzwischen vermutete, daß er damit nicht J4, sondern J6 gemeint hat).

Meinem Vater, meiner Tante Gudrun Schwarzer und meinen Großeltern für ihre Liebe und Unterstützung, ohne die ich nicht so weit gekommen wäre.

All meinen Freunden für ihre Freundschaft und ihr Verständnis und dafür, daß sie zu mir gehalten haben.

Lutz Steidel dafür, daß er kam, sah und nicht aufgab, bis er gesiegt und die Fledermäuse aus meiner Dachkammer vertrieben hatte, für seine Unterstützung, Anfeuerung, liebevolle Bemutterung und das Eindämmen von Wut und Verzweiflung bei Eigenwilligkeit des Computers während des Schreibens dieser Arbeit, sowie für alles andere.

Publikationen

Posterbeitrag

Ackermann, K., Schürmann, A., Sokolowski, R., Scholz, M., Wolfes, H. (2000)

Characterization of direct readout contacts of the Myb DNA binding domain.

Sixteenth Annual Meeting on Oncogenes and Tumor Suppressors, Frederick, Maryland

Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation bestand in der Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Transkriptionsfaktor c-Myb und dem Zinkfinger-Protein FOG-1, einem Kofaktor des Transkriptionsfaktors GATA-1.

Nach anfänglichen Schwierigkeiten gelang es, das *full-length-fog-1*-Gen zu isolieren und in einen eukaryontischen Expressionsvektor zu klonieren. Mit diesem Konstrukt wurden Transkriptionen für Reportergen-*Assays* durchgeführt, ferner diente es als Ausgangsmaterial für weitere Klonierungen.

In Reportergen-*Assays* ließ sich eine dosisabhängige inhibitorische Wirkung von FOG-1 auf die Transaktivierungsaktivität von c-Myb nachweisen. Eine c-Myb-Deletionsmutante, in der die C-terminal gelegene Negativ Regulatorische Domäne deletiert war, zeigte eine stärkere Transaktivierung als das Wildtyp-c-Myb, wurde aber in gleicher Weise von FOG-1 inhibiert. Es wurden Versuche mit FOG-1-Deletionsmutanten, in denen einer oder mehrere der neun Zinkfinger des Proteins deletiert worden waren, durchgeführt. Sie zeigten, daß die Zinkfinger 1-4 und 6 für inhibitorische Wirkung von FOG-1 auf c-Myb nicht essentiell sind.

Durch Koimmunopräzipitation von c-Myb mit FOG-1 und FOG-1 mit c-Myb aus Zellkernextrakten kotransfizierter Zellen wurde ein weiteres Indiz für die Wechselwirkung gefunden.

Im Verlauf der Versuche, c-Myb aus Zellkernextrakten über SDS-PAGE und anschließendem Western Blot nachzuweisen, zeigte sich ein reziproker Zusammenhang zwischen der Dichte der transfizierten Zellen und der Intensität der auf dem Western Blot gefundenen c-Myb-Banden. Anhand von parallel durchgeführten Transfektionen an unterschiedlich dicht ausgesäten COS-7-Zellen ließ sich dieses Phänomen bestätigen. Es wurde für zwei verschiedene c-myb-Vektoren gefunden, ist also vektorunabhängig.

Schlagworte: c-Myb, FOG-1, Protein-Protein-Interaktionen

Abstract

The aim of this thesis was to characterize the interaction between the transcription factor c-Myb and the zinc finger protein FOG-1, a cofactor of the transcription factor GATA-1.

After initial difficulties, the *fog-1* gene could be isolated and was cloned successfully into an eukaryotic expression vector. In cell culture, the construct was used for transient transfections and reporter gene assays, furthermore it served as starting material for additional plasmids.

The reporter gene assays revealed a dose-dependent inhibitory effect of FOG-1 on the transactivating activity of c-Myb. In the transfection assays, a c-Myb deletion mutant lacking the C-terminal negative regulatory domain exhibited stronger transactivating activity, although it was unchangingly inhibited by FOG-1. Several FOG-1 mutants were generated, in which one or more of the nine zinc fingers were deleted. With these mutants, it was established that zinc fingers 1-4 and 6 are not essential for the inhibitory effect of FOG-1 on c-Myb. Further evidence for the physical interaction of FOG-1 and c-Myb *in vivo* came from co-immunoprecipitation experiments, in which an anti FOG-1 antibody precipitated Myb and *vice versa*.

Furthermore, it was observed by Western Blot analysis that the abundance of c-Myb in nuclear extracts of transfected cells is reciprocally correlated with the cell density. This finding was confirmed by parallel transfections in which the cells were seeded in varied densities. In addition, it was shown that this effect is not vector-dependent.

Key words: c-Myb, FOG-1, protein-protein interaction

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Krankheit Krebs	1
1.2 Regulation der Transkription in Eukaryonten	4
1.3. Der Transkriptionsfaktor Myb	5
1.3.1 Die myb-Familie	5
1.3.2 Das Protoonkogen c-myb	6
1.3.2.1 Die DNA-Bindungsdomäne	7
1.3.2.2 Die Transaktivierungsdomäne	8
1.3.2.3 Die Negativ Regulatorische Domäne	9
1.3.2.4 Phosphorylierungsstellen	10
1.3.2.5 C-Myb und Kofaktoren	10
1.3.3 Myb und die Zelldifferenzierung	12
1.4 GATA-1 und FOG-1	14
1.4.1 GATA-1	14
1.4.2 FOG-1	15
1.4.3 Die Rolle von GATA-1 und FOG-1 bei der Zelldifferenzierung	16
1.4.4 Möglicher Antagonismus zwischen c-Myb und GATA-1	18
1.5 Zielsetzung	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Mikrobiologische Methoden	21
2.1.1 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	21
2.1.1.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	21
2.1.1.1.1 Medien zur Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	22
2.1.1.2 Chemische Transformation	22
2.1.1.2.1 Puffer und Lösungen für Herstellung kompetenter <i>E.coli</i>	23
2.1.1.3 Proteinexpression	24
2.1.1.4 Amplifikation einer cDNA-Bibliothek	25
2.1.1.4.1 Medien zur Kultivierung des <i>E.coli</i> -Stammes XL1-Blue	29
2.1.1.4.2 Puffer für die Amplifizierung und Titration der cDNA-Bibliothek	30
2.1.2 Verwendete Bakterienstämme	30
2.1.3 Verwendete Vektoren	31
2.1.3.1 pGEX-Vektoren	31

2.1.3.2 pQE-Vektoren	33
2.2 Arbeiten mit Eukaryontischen Zellen.....	34
2.2.1 Verwendete Zelllinien	34
2.2.2 Medien für die Zellkultur	35
2.2.3 Puffer und Lösungen für die Zellkultur	35
2.2.4 Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien.....	36
2.2.4.1 Passagieren von Zellen.....	37
2.2.4.2 Zellzahlbestimmung.....	38
2.2.4.3 Lagerung von Zellen	38
2.2.5 Transiente Transfektionen.....	39
2.2.5.1 Transfektion mit <i>Effectene</i> TM	40
2.2.5.2 Ernten von Zellen.....	41
2.2.6 Reportergen-Assays.....	42
2.2.6.1 β -Galaktosidase-Assay	42
2.2.6.2 Luziferase-Assay	42
2.2.6.3 Puffer und Lösungen für das Reportergen-Assay	43
2.2.6.3.1 β -Galaktosidase-Assay	43
2.2.6.3.2 Luziferase-Assay	44
2.2.7 Vektoren für die Zellkultur	45
2.3 Molekularbiologische Methoden	55
2.3.1 Isolierung von mRNA aus eukaryontischer Gesamt-RNA	55
2.3.2 Plasmidpräparation aus <i>Escherichia coli</i>	55
2.3.2.1 Puffer für Plasmid-DNA Präparationen aus <i>E.coli</i> (Qiagen).....	57
2.3.3 DNA-Aufreinigung mit dem <i>QIAquick Spin System</i>	57
2.3.3.1 DNA-Isolierung aus Agarosegelen	57
2.3.3.1.1 Puffer für die DNA-Isolierung aus Agarosegelen.....	58
2.3.3.2 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	58
2.3.3.2.1 Puffer für die Aufreinigung von PCR-Produkten	59
2.3.4 DNA-Modifikationen.....	59
2.3.4.1 Restriktionsspaltung von DNA	59
2.3.4.1.1 Puffer für Restriktionsenzyme	59
2.3.4.2 Ligation linearer DNA	60
2.3.4.3 Dephosphorylierung von DNA	60
2.3.5 PCR.....	61
2.3.5.1 PCR	61

2.3.5.2 RT-PCR	63
2.3.5.3 Verwendete PCR-Primer	64
2.3.5.4 Nachweis von Mycoplasmen mittels PCR	65
2.3.6 <i>In vitro</i> -Transkription	66
2.3.6.1 <i>In vitro</i> -Transkription	66
2.3.6.2 <i>In vitro</i> -Transkription/Translation	67
2.3.7 Gel-Elektrophoresen	70
2.3.7.1 Agarosegel-Elektrophorese	70
2.3.7.1.1 Puffer und Lösungen für Agarosegele	70
2.3.7.1.2 Längenmarker für Agarosegele	71
2.3.7.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)	72
2.3.7.2.1 Puffer und Lösungen für Polyacrylamidgele	72
2.3.7.2.1 Längenmarker für Polyacrylamidgele	73
2.3.7.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	73
2.3.7.3.1 Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli	74
2.3.7.3.2 Längenmarker für SDS-Polyacrylamidgele	75
2.3.8 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	76
2.3.8.1. Zellaufschluß und Bindung an GSH-Sepharose	76
2.3.8.2 Elution	76
2.3.8.3 Puffer für die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	77
2.3.9 Aufreinigung von (His) ₆ -Tag-Proteinen	77
2.3.9.1 Isolierung und Aufreinigung von (His) ₆ -Tag-Proteinen aus dem Zellysat	77
2.3.9.2 TCA-Fällung	78
2.3.9.2 Puffer für die Aufreinigung von (His) ₆ -Tag-Proteinen	78
2.3.10 Gewinnung von Kern-Proteinen aus eukaryontischen Zellen	79
2.3.11 Immunopräzipitation mit CNBr-aktivierter Sepharose	81
2.3.11.1 Kopplung des Antikörpers an die Sepharose	81
2.3.11.2 Immunopräzipitation	81
2.3.11.3 Puffer und Lösungen für die Immunopräzipitation	82
2.3.12 Western Blot	82
2.3.12.1 Durchführung	82
2.3.12.2 Eingesetzte Antikörper	83
2.3.12.3 Verwendete Puffer und Lösungen	83
2.3.13 Proteinbestimmung nach Bradford	84
2.3.13.1 Bradford-Reagenz	84

3. Durchführung und Ergebnisse	85
3.1 Isolierung und Klonierung des fog-1-Gens.....	85
3.1.1 RT-PCR.....	85
3.1.2 PCR.....	86
3.1.2.1 PCR an der <i>Mouse Spleen</i> cDNA TriplEx TM -Library	86
3.1.2.2 PCR an <i>full length</i> -fog-1-Plasmiden.....	87
3.1.3 Klonierung des fog-1-Gens in den pcDNA-Vektor	88
3.2 Reporterassays.....	88
3.2.1 Untersuchung des Einflusses von FOG-1 auf c-Myb	89
3.2.1.1 Transfektion von c-Myb, FOG-1 und C/EBP α	89
3.2.1.2 Dosisabhängige Regulation der c-Myb Aktivität durch FOG-1	90
3.2.1.3 Einfluß von FOG-1 auf eine c-Myb-Deletionsmutante	91
3.2.1.4 Transfektionen mit weiteren c-Myb-Deletionsmutanten	92
3.2.1.5 Transfektionen mit FOG-1-Deletionsmutanten	93
3.2.1.5.1 Deletion des 6. Zinkfingers.....	93
3.2.1.5.2 Deletion der Zinkfinger 1-4	95
3.2.1.5.3 Deletion der Zinkfinger 1-4 und 6	96
3.2.2 Transfektionen mit pcDNAGATA-1	97
3.2.3 Transfektionen mit dem <i>Mercury Pathway Profiling Luciferase System</i>	97
3.3 Probleme mit der Zellkultur.....	99
3.4 Expression von FOG-1-Fragmenten in <i>E. coli</i>	100
3.5 <i>In vitro</i> -Transkription/Translation	102
3.6 Isolierung von c-Myb und FOG-1 aus eukaryontischen Zellen.....	103
3.6.1 Klonierung eines HA- <i>Tags</i> in den pcDNAFOG-1-Vektor	103
3.6.2 Nachweis der <i>in vitro</i> -Interaktion von c-Myb und FOG-1	104
3.6.2.1 Immunopräzipitation von c-Myb	104
3.6.2.2 Immunopräzipitation von HA-FOG-1	105
3.6.2.3 Koimmunopräzipitation von c-Myb und HA-FOG-1	106
3.7 Abhängigkeit der Expression von c-Myb von der Zelldichte.....	108
4. Zusammenfassung und Diskussion	110
5. Ausblick	113
6. Literaturverzeichnis.....	115
7. Anhang	123

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AAP	Agaroseauftragspuffer
ad	auffüllen auf
Amp	Ampicillin
AMV	<i>avian myeloblastosis virus</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
c-	zellulär
C-	Carboxyl-
CKII	Caseinkinase II
Da	Dalton
DBD	DNA-Bindungsdomäne
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β-aminoethylether) N,N,N',N'-tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
GSH	Gluathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Human influenza hemagglutinin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethan-sulfonsäure
His	Histidin
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HTH	Helix-Turn-Helix
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
LAP	Laemmli-Auftragspuffer
LB	Luria Bertani
LDB	<i>Lambda dilution buffer</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MRE	<i>myb responsive element</i>
n	nano
N-	Amino-

NRD	Negativ Regulatorische Domäne
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pfu	<i>Plaque forming unit</i>
PMSF	Phenylmethylylsufonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese mit SDS
TAD	Transaktivierungsdomäne
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TF	Transkriptionsfaktor
TPE	Tris-Phosphat-EDTA-Puffer
UV	Ultraviolett
v-	Viral
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent
μ	Mikro
λ	Wellenlänge

Aminosäuren werden mit dem internationalen Ein- oder Dreibuchstabencode abgekürzt, Basen gemäß den *IUB tentative rules*.

Entsprechend den IUPAC-Regeln werden die Bezeichnungen von Genen klein geschrieben (z.B. c-myb), die Namen von Proteinen hingegen groß (z.B. c-Myb).

1. Einleitung

Eines der faszinierendsten Gebiete der Biologie ist die Zelldifferenzierung von omnipotenten Vorläufern zu reifen, spezialisierten Zellen. Gesteuert wird die Differenzierung durch Transkriptionsfaktoren wie z.B. c-Myb, der für die Entwicklung hämatopoetischer Zellen essentiell ist. GATA-1 ist ein weiterer, die Hämatopoese steuernder Transkriptionsfaktor, und es gibt Hinweise, daß c-Myb und GATA-1 antagonistische Funktionen ausüben. In der vorliegenden Arbeit wird die Interaktion zwischen c-Myb und FOG-1, einem Kofaktor von GATA-1, untersucht.

1.1 Die Krankheit Krebs

Neben Herz- und Kreislauferkrankungen ist Krebs eine der Haupttodesursachen in den westlichen Industrienationen. Obwohl dank schon viele Jahrzehnte wäherender Forschung die Behandlungsmethoden immer weiter verbessert wurden und die Heilungschancen deutlich gestiegen sind, haben erst Fortschritte der Biochemie und insbesondere der Gentechnik die Untersuchung der Protein-DNA- und auch Protein-Protein-Interaktionen innerhalb der Zelle ermöglicht. Diese Vorgänge sind essentiell für das Aufrechterhalten der zellulären Funktionen und aller lebenden Organismen. Durch diese Erkenntnisse rückt auch das Verständnis für die Ursachen und Abläufe der Krebsentstehung in greifbare Nähe.

Krebs ist eine genetische Krankheit, die durch Mutationen in oder Deletion von verschiedenen Genen entsteht. Dies führt zu einer kontinuierlichen und unkontrollierten Proliferation der Zellen. Krebs ist nicht das Produkt eines einzelnen Ereignisses, sondern das Resultat von akkumulierenden Mutationen in verschiedenen wachstumsregulierenden Genen der Zelle (Fearon und Vogelstein, 1990).

Tumore sind in der Regel klonal, d.h. alle Zellen eines Tumors lassen sich auf eine Ursprungszelle zurückführen. Der erste Schritt in der Krebsentwicklung, die Tumorinitiation, besteht in einer einzelnen Veränderung im Genom einer einzelnen Zelle, durch die sie einen Wachstumsvorteil gegenüber den ihr benachbarten Zellen erhält. Die Zelle beginnt abnorm zu proliferieren und ein frühes, gutartiges Adenom zu bilden. Mit der erhöhten Teilungsrate steigt auch die Wahrscheinlichkeit für eine zweite Mutation in einer ihrer Tochterzellen,

durch den sie einen weiteren Selektionsvorteil erhält und wiederum stärker proliferiert als die übrigen Zellen des beginnenden Tumors. Im weiteren Verlauf der Krebsentwicklung (Tumorprogression) kommt es nach und nach zu zusätzlichen Mutationen im Genom neu entstehender Tumorzellen, durch die deren Wachstumskontrollfunktionen immer weiter ausgeschaltet werden, was ihren Selektionsvorteil mehr und mehr erhöht und schließlich zur Entstehung eines klonalen, malignen Tumors führt (siehe Abb. 1.1).

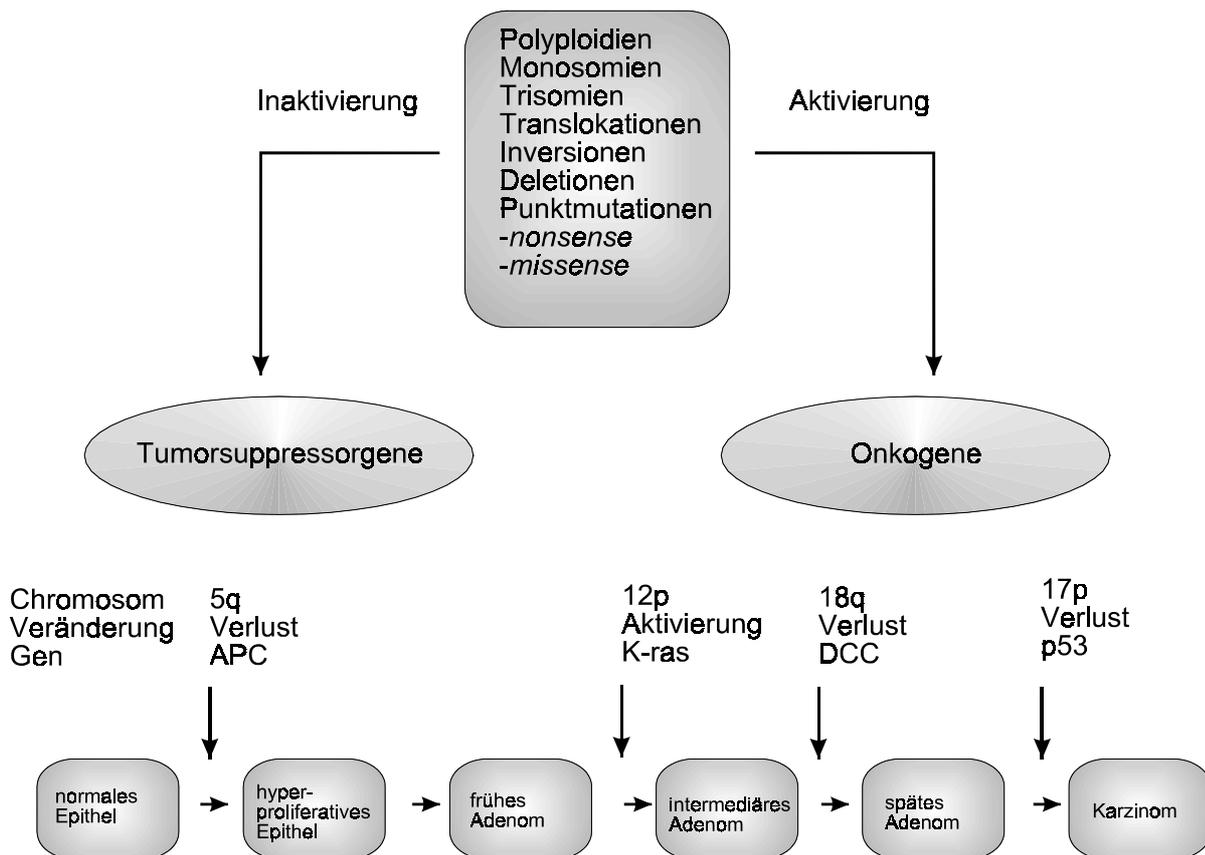


Abb. 1.1: Mehrstufenmodell der Karzinogenese nach (Fearon und Vogelstein, 1990)

Durch Untersuchungen an tumorinduzierenden Retroviren konnten die ersten an der Krebsentstehung beteiligten Gene charakterisiert werden. Es wurde festgestellt, daß die von den Viren eingeschleusten, krebsauslösenden Gene sich von zelleigenen Homologen ableiten, die im Laufe der Evolution durch Transduktionsereignisse in das Genom des Virus gelangt sind. Die entsprechenden zelleigenen Gene kodieren im allgemeinen an den Vorgängen der Proliferation und deren Kontrolle beteiligte Proteine, die sich in fünf funktionelle Klassen aufteilen lassen:

- Wachstumsfaktoren
- Rezeptor-Tyrosinkinasen
- GTP-bindende Proteine
- Serin/Threoninkinasen
- Nukleäre Faktoren

Ihre viralen Gegenstücke sind häufig verkürzt oder mutiert, so daß ihre negative Regulierung unterdrückt wird und sie so eine unkontrollierte Proliferation der Wirtszelle auslösen können. Diese krebsauslösenden Gene werden als Onkogene bezeichnet, ihre zellulären Gegenstücke sowie auch alle anderen zellulären Gene, die durch Mutation selbst zu Onkogenen werden können, als Proto-Onkogene.

Neben den Proto-Onkogenen gibt es noch eine zweite Gruppe von Genen, deren Mutation oder Deletion zur Tumorentstehung beiträgt. Hierbei handelt es sich um die Tumorsuppressorgene. Ihre Expression führt zu einer Proliferationsinhibition und letztendlich zur Apoptose, wodurch sie die Tumorbildung verhindern. Dadurch können sie den Onkogenen entgegenwirken.

Ein Unterschied zwischen diesen beiden Klassen ist, daß bei Proto-Onkogenen ein zum Onkogen mutiertes Allel ausreicht, um durch Expression des fehlerhaften Proteins die Tumorbildung zu begünstigen, die Mutation also dominant ist. Bei Tumorsuppressorgenen hingegen genügt ein intaktes Allel, um ihre Kontrollfunktion aufrechtzuerhalten. Erst bei Verlust oder Mutation beider Allele erhält die betroffene Zelle einen weiteren Wachstumsvorteil, der sie einen Schritt näher zur Bildung eines malignen Tumors bringt; die Mutation an Tumorsuppressorgenen ist also rezessiv. Es gibt jedoch Ausnahmen wie z.B. das p53-Gen, dessen mutiertes Genprodukt das auf dem zweiten, noch intakten Allel exprimierte Wildtyp-Protein inaktiviert, dessen Tumorsuppressoraktivität unterdrückt und so wie ein Onkogen wirkt (Fearon and Vogelstein, 1990).

Praktisch alle bekannten Onkogene und Proto-Onkogene finden sich entlang des Signalweges, durch den Zellen mitogene Signale empfangen und ausführen. Hierbei kann es sich um strukturelle Mutationen handeln, die dazu führen, daß das betroffene Protein ohne äußeres Signal konstitutiv aktiviert wird (z.B. bei Proteinkinasen), oder aber um regulatorische Mutationen, die eine Expression z.B. von Wachstumsfaktoren zur falschen Zeit oder am falschen Ort bewirken. Von solchen regulatorischen Mutationen sind häufig Transkriptionsfaktoren betroffen, deren eigene Expression normalerweise hochgradig reguliert wird und deren Mutation zu

einer dauerhaften Veränderung im Muster der zellulären Genexpression führt, was wiederum ein verändertes Wachstumsverhalten zur Folge haben kann.

1.2 Regulation der Transkription in Eukaryonten

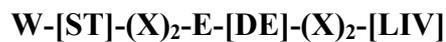
Da die Transkription der DNA in RNA der erste Schritt bei der Genexpression ist, stellt ihre Regulierung auch den wichtigsten Kontrollfaktor des Gesamtvorganges dar. Die eigentliche Kontrollfunktion üben hierbei spezielle Proteine, die Transkriptionsfaktoren aus. Sie sind in der Lage, bestimmte DNA-Sequenzen zu erkennen und spezifisch an sie zu binden, um dann der RNA-Polymerase den Zugang zur DNA zu ermöglichen, sie zu aktivieren und die Transkription in Gang zu setzen. Es sind immer mehrere Transkriptionsfaktoren an der Transkriptionsinitiation beteiligt. Sie binden an verschiedenen Stellen des Promotors und Enhancers oder als Kofaktoren an andere Transkriptionsfaktoren und bilden zusammen mit der RNA-Polymerase einen Komplex, durch den sie erst arbeitsfähig wird. Einige Transkriptionsfaktoren haben auch die Aufgabe, die Chromatinstruktur zu verändern und so die DNA für die RNA-Polymerase zugänglich zu machen. Es gibt allgemeine Faktoren, die für die Initiation an allen oder zumindest vielen Promotoren erforderlich sind. Andere Transkriptionsfaktoren sind genspezifisch und werden nur für bestimmte Promotoren benötigt. Sie sind für die Kontrolle der zell- oder zyklusspezifischen Genexpression essentiell.

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die aus verschiedenen, unabhängigen Domänen, sogenannten Modulen zusammengesetzt sind. Zu diesen Modulen gehören z.B. die DNA-Bindungsdomäne, die es dem Transkriptionsfaktor ermöglicht, spezifisch eine bestimmte DNA-Sequenz zu erkennen und daran zu binden, und die Transaktivierungsdomäne, eine an sauren Aminosäuren reiche Region, die mit anderen Transkriptionsfaktoren wechselwirkt und auf diese Weise das Signal zur Aktivierung der Transkription geben kann.

1.3. Der Transkriptionsfaktor Myb

1.3.1 Die myb-Familie

Viele Transkriptionsfaktoren können Proteinfamilien zugeordnet werden, deren Mitglieder sich durch eine homologe Aminosäuresequenz, ein sogenanntes Motiv, auszeichnen. Eine solche Familie stellen die Myb-Proteine dar, deren DNA-Bindungsdomäne aus zwei bis drei Wiederholungen (*Repeats*) einer hochkonservierten Aminosäuresequenz besteht. Diese Konsensussequenz wird laut Swiss-Protein-Bank (PROSITE) wie folgt angegeben:



Hierbei bezeichnen eckige Klammern alternative Aminosäuren an den betreffenden Positionen, die Indizes bezeichnen die jeweilige Anzahl der beliebigen Aminosäure X.

Die ersten Myb-Proteine wurden als Genprodukte des aus den Retroviren AMV (*avian myeloblastosis virus*) (Hall, 1941; Roussel, 1979) bzw. E26 (Ivanov, 1962) stammenden Onkogens v-myb isoliert. Das virale Onkogen v-myb induziert bei Hühnern myeloide Leukämien. Das entsprechende zelluläre Gen c-myb übt als Transkriptionsfaktor eine zentrale Funktion bei der Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen aus. Es wurde in vielen tierischen und pflanzlichen Spezies, unter anderem auch im Menschen (Majello *et al.*, 1986) und in der Maus (Gonda *et al.*, 1985) gefunden. Die viralen Proteine unterscheiden sich von dem zellulären Protein durch mehrere Punktmutationen in der DNA-Bindungsdomäne sowie vor allem durch N- und C-terminale Deletionen.

Zwei weitere, unter anderem ebenfalls im Menschen vorkommende (Nomura *et al.*, 1988) Mitglieder der Myb-Familie sind die Transkriptionsfaktoren A-Myb und B-Myb. Insgesamt sind inzwischen zahlreiche myb-homologe Gene in Tieren, vor allem aber in Pflanzen gefunden worden. Sie sind ebenfalls an der Regulation der Zellproliferation beteiligt.

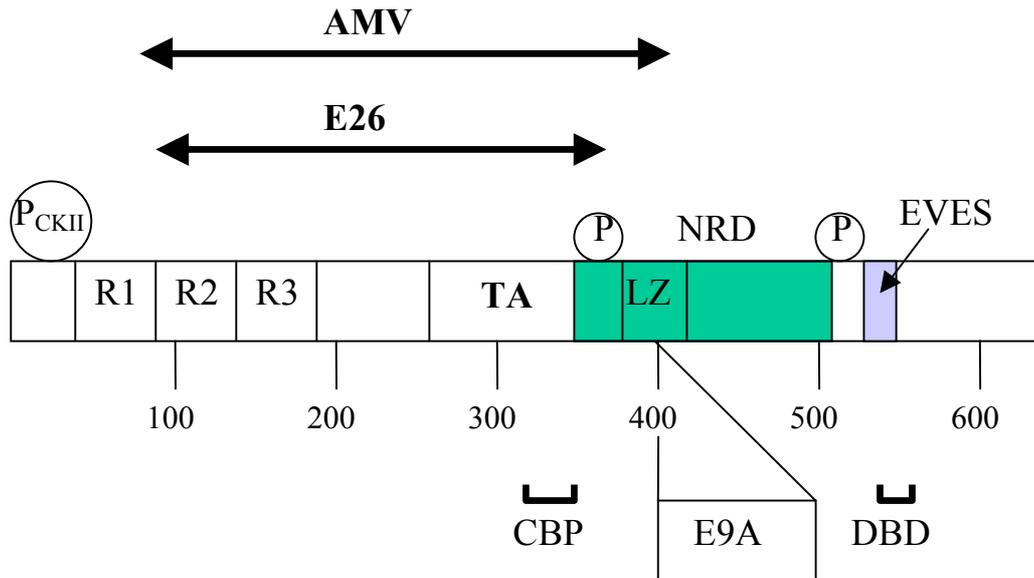
1.3.2 Das Protoonkogen c-myb

Bei dem vom Protoonkogen c-myb kodierten Protein handelt es sich um einen im Zellkern lokalisierten Transkriptionsfaktor, der in der Lage ist, sowohl eine spezifische DNA-Sequenz zu binden als auch mit anderen Proteinen zu interagieren, um die Transkription von Genen zu regulieren (Ness 1996). Das Protein besteht aus 636 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 75 kDa. Bei der von Myb erkannten DNA-Sequenz (C/T)AAC(G/T)G (*myb responsive element*, MRE) ist vor allem das Kernmotiv AAC von Bedeutung (Howe and Watson, 1991; Weston 1992).

C-Myb wird in vielen verschiedenen Geweben, in besonders hohem Maße jedoch Vorläuferzellen der hämatopoetischen Linie exprimiert, wobei die Expression negativ reziprok mit dem Differenzierungsgrad korreliert; sie ist in undifferenzierten Zellen hoch, in reifen, ausdifferenzierten Zellen ist sie fast völlig ausgeschaltet (Golay *et al.*, 1992; Gonda and Metcalf, 1984; Westin *et al.*, 1982). Durch transiente Transfektion von c-myb in hämatopoetische Zellen läßt sich deren Differenzierung inhibieren und ihre Proliferationsrate steigern (Clarke *et al.*, 1988; McClinton *et al.*, 1990). Die Expression von c-myb ist unter anderem in embryonalen Hirnzellen (Gozes *et al.*, 1987), jedoch auch in diversen Tumorzelllinien (Welter *et al.*, 1990) und verschiedenen humanen Melanomen (Dasgupta and Reddy, 1989) nachgewiesen worden. Mäuse mit einer homozygoten Inaktivierung des c-myb-Gens zeigen eine schwere Störung der Hämatopoese, sie sterben am 15. Tag der Gestation an Anämie (Mucenski *et al.*, 1991). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß c-Myb eine wichtige Rolle für die Differenzierung und Proliferation von Zellen, besonders in hämatopoetischen Linien, spielt (Caracciolo *et al.*, 1990, Golay *et al.*, 1991).

Die onkogene Form von c-myb zeichnet sich durch die Deletion 3'- und/oder 5'-terminaler Sequenzen, ähnlich denen im Onkogen v-myb zu findenden, aus (Dubendorff *et al.*, 1992; Vorbrueggen *et al.*, 1994). Diese Deletionen führen zu dem Verlust wesentlicher Abschnitte des zellulären Proteins, wie der Casein-Kinase-II-Phosphorylierungsstelle und der Negativ Regulatorischen Domäne (siehe Abbildung 1.2). Die Abwesenheit negativ regulierender Faktoren ist offenbar für die Aktivierung der onkogenen Fähigkeiten von c-Myb essentiell.

Wie andere Transkriptionsfaktoren ist auch das c-Myb-Protein aus verschiedenen funktionellen Domänen aufgebaut (Ness, 1996), die in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt sind:



- P_{CKII}: Phosphorylierungsstelle der Casein-Kinase II (Serinrest 11, 12)
- P: weitere Phosphorylierungsstellen
- R1R2R3: DNA-Bindungsdomäne, ca. AS 35-192
- TA: Transaktivierungsdomäne, ca. AS 270-330
- NRD: Negativ Regulatorische Domäne, ca. AS 350-500
- LZ: Leucinreiche Region, ca. AS 375-407
- E9A: Alternatives c-Myb aus Maus (enthält ein zusätzliches Exon und ist damit 85 kDa = 760 AS groß)
- AMV: Länge von v-Myb aus AMV
- E26: Länge des Myb-Anteils am p135^{gag-myb-ets} Fusionsprotein (v-Myb aus dem E26-Virus)
- CBP: Bindungsdomäne für die Interaktion mit CBP, AS 317-341
- DBD: Bindungsdomäne für die Intramolekulare Interaktion mit der DNA-Bindungsdomäne, AS 541-567
- EVES: EVES-Motiv, ca. AS 510-550

Abb. 1.2: Schematischer Aufbau des c-Myb-Proteins modifiziert nach (Lüscher *et al.*, 1990; Kiewitz und Wolfes, 1997)

1.3.2.1 Die DNA-Bindungsdomäne

Die aus 155 Aminosäuren bestehende DNA-Bindungsdomäne liegt im N-terminalen Bereich des Proteins (AS-Position 38-193) und setzt sich aus drei zueinander homologen Bereichen von je 51-52 Aminosäuren, den sogenannten *Repeats* (R1R2R3) zusammen. In jedem dieser *Repeats* bilden drei Tryptophanreste, die durch jeweils 18 bzw. 19 Aminosäuren voneinander getrennt sind, ein charakteristisches Muster. Die *Repeats* 2 und 3 bilden jeweils ein *Helix-Turn-Helix*-Motiv aus, mit dem sie die spezifische DNA-Sequenz erkennen und binden (Ogata *et al.*, 1994; Ogata *et al.*, 1995; McIntosh *et al.*, 1998). Der erste *Repeat* ist für die Bindung an DNA nicht unbedingt erforderlich, erhöht aber die Spezifität der DNA-Erkennung, indem er die Bindung an die kanonische Sequenz stabilisiert (Ebner *et al.* 1994).

Beide Formen des v-Myb-Onkoproteins sind am N-Terminus verkürzt, wodurch ihnen der erste *Repeat* fehlt. Vermutlich binden sie dadurch weniger spezifisch als c-Myb und können so auch solche Gene regulieren, auf die c-Myb ursprünglich keinen Einfluß hatte.

Als Myb-regulierte Gene, dessen Promotor die Myb-Erkennungssequenz AACGT enthält, wurden unter vielen anderen *mim-1* (Ness *et al.*, 1989) und *c-myb* selbst (Nicolaidis *et al.*, 1991) identifiziert. *Mim-1* ist an der Regulation von Proliferation und Differenzierung beteiligt und wird spezifisch in lymphoiden bzw. myeloiden Zellen exprimiert.

1.3.2.2 Die Transaktivierungsdomäne

Die Transaktivierungsdomäne von c-Myb weist eine geringere Homologie zu anderen Mitgliedern der Myb-Familie auf als die hochkonservierte DNA-Bindungsdomäne. Durch Untersuchungen an Fusionsproteinen aus verschiedenen Fragmenten des transaktivierenden Bereichs aus c-Myb und der DNA-Bindungsdomäne von Gal4 konnte sie auf die Aminosäuren 257-325 eingegrenzt werden (Bortner und Ostrowski, 1991; Lane *et al.*, 1990, Sakura *et al.*, 1989). Elf Aminosäuren aus dieser Region sind für die Funktion der Transaktivierungsdomäne unabdingbar; werden sie deletiert, wird dadurch die Transaktivierungsaktivität völlig ausgeschaltet, obwohl sich die Gesamtladung der Domäne dabei kaum verändert (Weston and Bishop, 1989).

Wie auch bei vielen anderen Transkriptionsfaktoren festgestellt, hat die Transaktivierungsdomäne von c-Myb einen hydrophilen und schwach aziden Charakter. Bisher ist nicht bekannt, ob die Azidität oder eher eine besondere Struktur die transaktivierende Aktivität der Region ausmacht, oder ob vielleicht beide Eigenschaften hierfür notwendig sind. Eine maximale Transaktivierung wird erreicht, wenn neben der eigentlichen Transaktivierungsdomäne auch ein C-terminal gelegener Bereich aus 10 Aminosäuren EFAETLQF(I/L)D zur Verfügung steht, der nach AS 392-396 als FAETL-Motiv bezeichnet wird (Fu and Lipsick, 1996).

1.3.2.3 Die Negativ Regulatorische Domäne

Die Negativ Regulatorische Domäne kann sowohl die Transaktivierung (Sakura *et al.*, 1989) als auch die Transformation (Kanei-Ishii *et al.*, 1992) inhibieren und die DNA-Bindung beeinflussen (Ramsay *et al.*, 1991). Sie erstreckt sich im C-terminalen Bereich von c-Myb zwischen den Aminosäuren 350 bis 500. In beiden v-Myb-Formen fehlt dieser Bereich. Deletiert man die Region aus c-Myb, so erhöht sich die Transaktivierungsfähigkeit des Proteins um das Zehnfache (Hu *et al.*, 1991; Kalkbrenner *et al.*, 1990; Ramsay *et al.*, 1991; Sakura *et al.*, 1989).

Es gibt zwei Theorien zum Mechanismus dieser negativen Regulation (siehe Abbildung 1.3). Ein Vorschlag beinhaltet einen zellulären Inhibitor, der an die Negativ Regulatorische Domäne bindet und dadurch die Affinität von Myb zu seiner spezifischen Erkennungssequenz beeinflusst (Verbrueggen *et al.*, 1994). Das zweite Modell hält eine intramolekulare Kontrollfunktion des C-Terminus von c-Myb auf die DNA-Bindungsdomäne für möglich. Diese Theorie wird durch die Identifizierung eines zwischen den Aminosäuren 541 und 567 liegenden Bereiches gestützt, der in der Lage ist, mit der DNA-Bindungsdomäne zu interagieren (Kiewitz und Wolfes, 1997). Ferner besitzt c-Myb etwa zwischen den Aminosäuren 510 und 550 ein EVES-Motiv, von dem bekannt ist, daß es phosphorylierungsabhängig mit der DNA-Bindungsdomäne wechselwirken kann und unter Myb-Proteinen hochkonserviert ist. (Dash *et al.*, 1996; Ness, 1996).

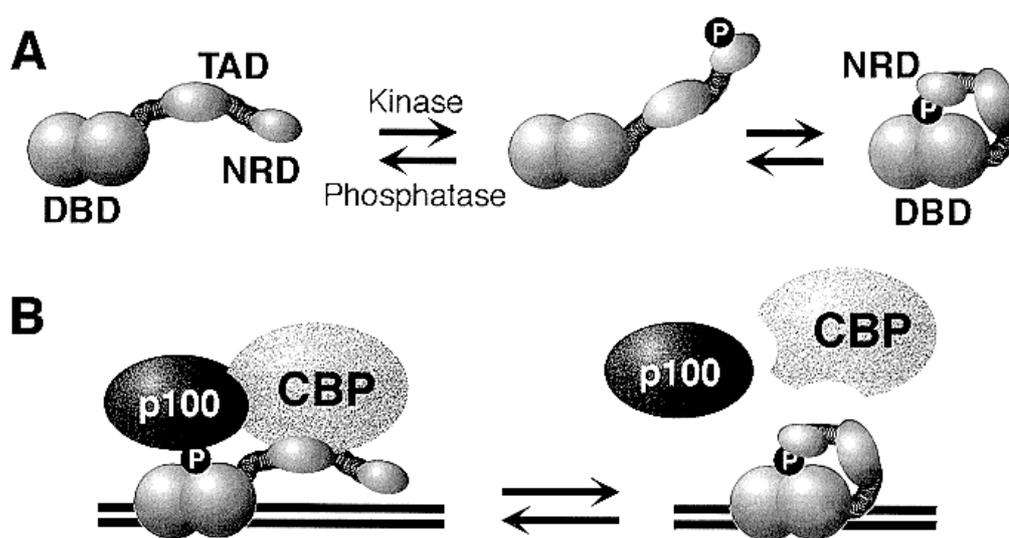


Abb. 1.3: Modell für die Regulation der NRD, entnommen aus Ness, (1996)
 A: Die Transkriptionsaktivität wird inhibiert durch Phosphorylierung im EVES-Motiv
 B: Die Zugänglichkeit für Kofaktoren könnte durch Rückfaltung gestört werden.

1.3.2.4 Phosphorylierungsstellen

Myb-Proteine unterliegen zellzyklusspezifischen Phosphorylierungen, insbesondere während der Mitose (Lüscher and Eisenman, 1992). Das c-Myb-Protein besitzt verschiedene Phosphorylierungsstellen, unter anderem eine p42^{mapk}-Kinase-Stelle am Serin 532, das zu dem unter 1.3.2.3 erwähnten EVES-Motiv gehört. Eine Phosphorylierung an dieser Stelle übt eine negative Regulierung auf die Aktivität des Proteins aus (Ness, 1996). Am N-Terminus befinden sich an Ser 11 bzw. Ser 12 Casein Kinase II (CKII)-Stellen, über die durch Phosphorylierung die Bindungsspezifität der DNA-Bindungsdomäne erhöht und somit ein weiterer Beitrag zur Regulation der Transkriptionsaktivität von c-Myb geleistet wird (Lüscher *et al.*, 1990). Der Verlust der CKII-Phosphorylierungsstelle z.B. in v-Myb oder anderen, onkogenen Mutanten, trägt ebenfalls zu den transformierenden Eigenschaften dieser Proteine bei.

1.3.2.5 C-Myb und Kofaktoren

Für die Funktion eines Transkriptionsfaktors ist nicht nur seine Interaktion mit DNA, sondern auch die Wechselwirkung mit anderen Proteinen entscheidend. Deshalb besteht ein großes Interesse, Kofaktoren von c-Myb zu identifizieren und ihre Wechselwirkungen zu charakterisieren. Unter anderem wurden bisher die Proteine NF-M, C/EBP β , p100, p300 und CBP als Kofaktoren identifiziert.

NF-M (*nuclear factor of myoid cells*) und das homologe C/EBP β (*C/CAAT-Box Enhancer Binding Protein Beta*) besitzen eine DNA-Bindungsdomäne und eine am C-Terminus lokalisierte *Leucine Zipper*-Dimerisierungsdomäne. Beide Proteine kooperieren *in vivo* mit Myb bei der Aktivierung des mim-1-Promotors. Myb und C/EBP β binden an benachbarte Sequenzen des mim-1-Promotors; der Komplex ist für die Induktion einer effizienten Expression des mim-1-Genes erforderlich. Ferner wurden v-Myb und C/EBP β aus Extrakten von durch v-Myb transformierte Myeloblasten kopräzipitiert. Die DNA-Bindungsdomänen von Myb und C/EBP β interagieren miteinander; dies bedeutet, daß die konservierten Domänen über die DNA-Erkennung und -Bindung hinaus eine Funktion für die Kooperativität beider Proteine besitzen (Ness, 1999; Ness, 1996; Ness *et al.* 1993).

CBP und das nahe verwandte p300 sind ubiquitäre Koaktivatoren, die mit zahlreichen Transkriptionsfaktoren interagieren (Ness, 1999). Sie werden als *bridging proteins* bezeich-

net, da sie durch Protein-Protein-Wechselwirkungen einen ternären Komplex mit zwei weiteren Proteinen ausbilden (Akimaru *et al.*, 1997). Ferner besitzen sie eine Histonacetyltransferaseaktivität, weshalb ihnen eine Rolle beim Chromatin-remodelling zugeschrieben wird (Kwok *et al.*, 1994).

CBP (*Creb Binding Protein*) wurde zuerst als Wechselwirkungspartner des Transkriptionsfaktors CREB (*cAMP Responsive Binding Protein*) identifiziert und bindet phosphorylierungsabhängig an dieses Protein (Arias *et al.*, 1994; Chrivia *et al.*, 1993; Eckner *et al.*, 1994, Kwok *et al.*, 1994). Die Interaktion von CBP mit Myb ist konstitutiv; sowohl Myb als auch CREB binden im selben Bereich von CBP. Verschiedene Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß CBP als Kofaktor für die Transkriptionsaktivität von Myb erforderlich ist. Interessanterweise kann es auch mit C/EBP β interagieren und dessen Aktivität steigern (Dai *et al.*, 1996; Oelgeschläger *et al.*, 1996a; Kiewitz and Wolfes, 1997, Mink *et al.*, 1997; Ness, 1999). CBP kann über verschiedene Domänen mit anderen Proteinen interagieren. Hierauf wird in Kapitel 1.4 näher eingegangen.

Faktor p100 kann sowohl mit Myb als auch mit NF-M bzw. C/EBP β interagieren. Er wurde zuerst als ECNA-2 (Epstein-Barr-Virus) bindendes Protein entdeckt (Tong *et al.*, 1995). Möglicherweise stellt er einen Regulationsfaktor für die Aktivität von Myb dar, da er ebenfalls ein EVES-Motiv enthält, über das er wie der Myb-C-Terminus an die DNA-Bindungsdomäne von c-Myb binden kann (Dash *et al.*, 1996).

Ferner wurden in unserer Arbeitsgruppe in *Yeast two-hybrid*-Experimenten mehrere Proteine gefunden, die an den C-Terminus von Myb (Aminosäuren 501-600) binden können (Siegert, 1998). Eines dieser Proteine wurde als Genprodukt des menschlichen Gens *rcd1+* identifiziert, das auch in anderen Organismen wie Hefen, *C. elegans* und verschiedenen Pflanzen vorkommt. Im Menschen wird *rcd1+* wie auch *c-myb* in Milz, Thymus, Hoden und Ovarien exprimiert, bei *Saccharomyces pombe* kontrolliert das *Rcd1+*-Protein die sexuelle Differenzierung des Spaltpilzes in Hungersituationen (Okazaki *et al.*, 1998). Da das Gen evolutionär konserviert ist, besteht die Vermutung, das es eine wichtige Rolle bei Zelldifferenzierungsprozessen spielt.

Ein weiterer putativer Kofaktor ist das Protein FOG-1, auf das in Kapitel 1.4 näher eingegangen wird.

1.3.3 Myb und die Zelldifferenzierung

Das wichtigste Ziel bei der biochemischen Charakterisierung von Protoonkogenen ist es, zu verstehen, auf welche Weise sie in zelluläre Vorgänge eingreifen. Im Falle von Myb stellt sich die Frage, wie c-Myb die Zelldifferenzierung beeinflusst, und in welchem Schritt v-Myb oder ein mutiertes c-Myb das Entstehen einer Leukämie fördert.

Die beiden v-Myb Formen der Hühner-Viren AMV und E26 sind einander ähnlich, doch greifen sie auf unterschiedliche Weise in die Zelldifferenzierung ein. E26 transformiert myeloblastenartige Zellen, die sich entlang sowohl der granulozytischen als auch der monozytischen Linie differenzieren können und für ihr Wachstum den Wachstumsfaktor cMGF (*chicken myelomonocytic growth factor*) benötigen. AMV hingegen transformiert Zellen, die bereits Monoblasten ähneln, die zur Differenzierung in Monozyten und Makrophagen, jedoch nicht in Granulozyten, induziert werden können. In beiden Fällen inhibieren die v-Myb-Proteine die Differenzierung und bewirken die Ausbildung eines unreifen Phänotyps.

Der Grund für die unterschiedlichen Wirkung von AMV-Myb und E26-Myb liegt darin, daß beide Proteine unterschiedliche Zielgene aktivieren. E26-Myb kann z.B. wie c-Myb gemeinsam mit C/EBP β das *mim-1*-Gen aktivieren, während AMV-Myb wegen dreier Punktmutationen in seiner DNA-Bindungsdomäne dazu nicht in der Lage ist. Statt dessen aktiviert AMV-Myb das *gbx2*-Gen, das einen Transkriptionsfaktor mit Homöodomäne kodiert (siehe Abbildung 1.4). Allerdings betreffen die Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne von AMV-Myb vorwiegend Aminosäuren, die mit anderen Proteinen wechselwirken können. Mit Cyp-40, einem Cyclosporin-A-bindenden Cyclophilin, wurde ein Protein gefunden, das über diese Kontaktstellen sowohl an c-Myb als auch an E26-Myb binden und deren DNA-Bindungsaktivität inhibieren kann. Wegen der mutierten DNA-Bindungsdomäne wird AMV-Myb nicht gebunden. Dieser Befund legt nahe, daß E26-Myb und AMV-Myb mit unterschiedlichen Kofaktoren interagieren und dadurch unterschiedliche Zielgene aktivieren.

Die unterschiedlichen Wirkungsweisen von AMV-Myb und E26-Myb führten zu dem Schluß, daß c-Myb zur Regulation der normalen myeloiden Zelldifferenzierung in zwei unterschiedlichen aktiven Zuständen vorliegt. Es wurde festgestellt, daß Ras und Rezeptor-Tyrosinkinasen jeweils in Kooperation mit c-Myb und E26-Myb die *gbx2*-Expression induzieren können. In normalen Zellen üben Rezeptor-Tyrosinkinasen die Kontrolle darüber aus, welche Zielgene Myb aktiviert und in welche Richtung demnach die Differenzierung der Zelle verläuft.

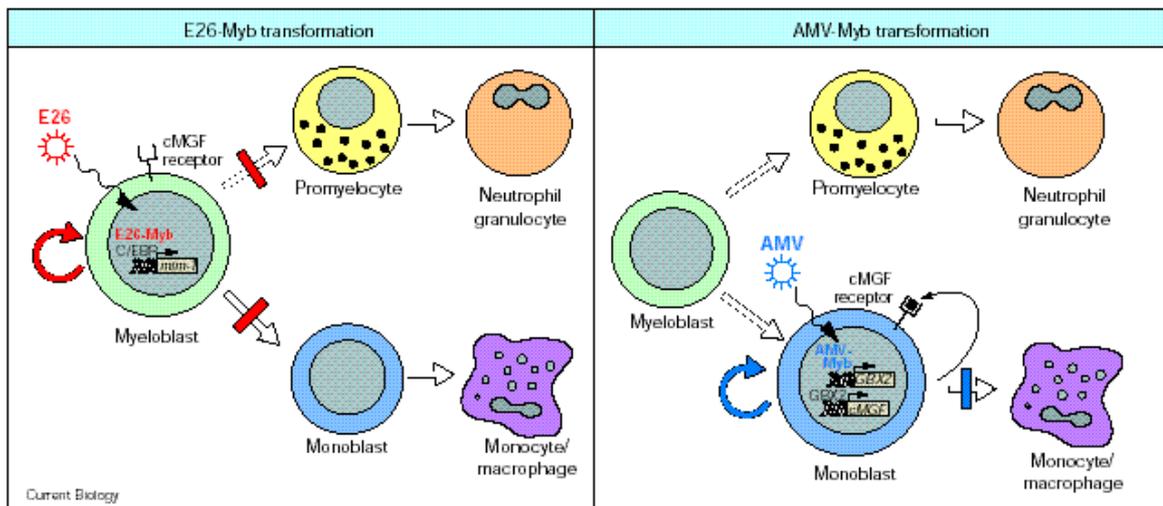


Abb. 1.4: Auswirkung der Transformation durch E26-Myb bzw. AMV-Myb auf myeloide Zellen in bezug auf Phänotyp und Differenzierung, entnommen aus (Graf, 1998)
 Weiße Pfeile zeigen Differenzierung an, rote und blaue Pfeile bedeuten Proliferation. Die Blockierung der Differenzierung durch Myb-Proteine wird durch rote bzw. blaue Balken angezeigt.

Ferner wurde festgestellt, daß E26-transformierte multipotente Vorläuferzellen die Expression von C/EBP herauf- und die Produktion von GATA-Proteinen herunterregeln, wenn sie zur Differenzierung in myeloide oder eosinophile Zellen induziert werden. In C/EBP α -defizienten Mäusen ist die Entwicklung neutrophiler und eosinophiler Granulozyten gehemmt.

Ein Modell postuliert, daß die Differenzierung bipotenter Vorläuferzellen der granulozytischen Linie durch fortlaufende Expression des mim-1-Genes und anderer Faktoren erfolgt. Hierbei wird c-Myb durch Tyrosinkinassen und/oder Ras derart modifiziert, daß es gbx2 aktivieren und somit die Vorläuferzellen zur Differenzierung zu Monoblasten anregen kann. Die Monoblasten reifen nach Aktivierung des Proteinkinase C-Pfades wiederum zu Monozyten und Makrophagen aus (siehe Abbildung 1.5). Dieses Modell ist spekulativ, da viele Faktoren unbekannt sind und viele möglicherweise beteiligte Transkriptionsfaktoren nicht mit einbezogen wurden (Graf, 1998).

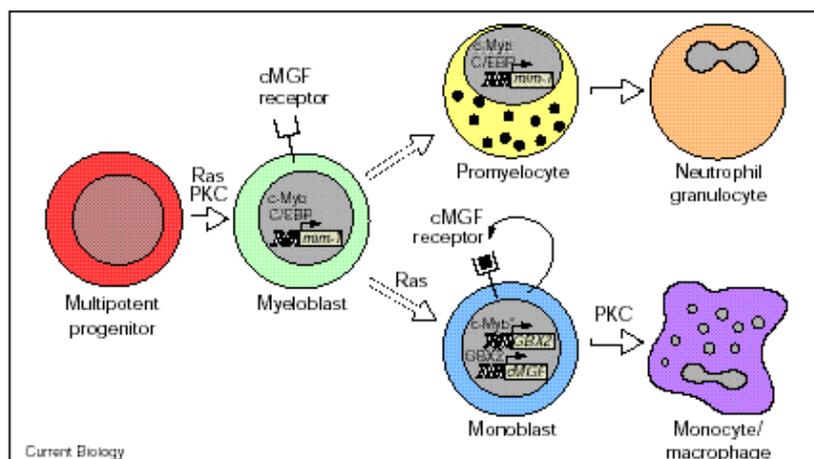


Abb. 1.5: Ein Modell für die Rolle von c-Myb in der normalen Differenzierung von Granulozyten und Makrophagen, entnommen aus (Graf, 1998)
 Ein Sternchen deutet mögliche Protein-Modifikationen an

1.4 GATA-1 und FOG-1

1.4.1 GATA-1

GATA-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die an die charakteristische DNA-Erkennungssequenz (A/T)GATA(A/G) binden, von der die Familie ihren Namen erhalten hat. GATA-1 ist das erste Mitglied der GATA-Proteinfamilie, das entdeckt wurde. Inzwischen sind weitere GATA-Proteine (GATA-2 bis GATA-6) identifiziert worden. Das zweite Charakteristikum dieser Proteine sind zwei benachbarte Zinkfinger-Motive, die alle die Form Cys-X₂-Cys-X₁₇-Cys-X₂-Cys besitzen, und die den Kontakt zur DNA-Erkennungssequenz herstellen (Kowalski *et al.*, 1999). Seit kurzem ist bekannt, daß Zinkfinger neben ihrer Funktion als DNA-Bindungsdomäne auch als Protein-Protein-Interaktionsdomäne fungieren können (Mackay and Crossley, 1998). Tatsächlich hat sich herausgestellt, daß der C-terminale Zinkfinger von GATA-1 sowohl notwendig als auch ausreichend für starke und sequenzspezifische Bindung an DNA ist, während der N-terminale Zinkfinger zwar essentiell für die Ausreifung erythroider Zellen, jedoch nicht fähig ist, isoliert an DNA zu binden. Dennoch erhöht er in Kooperation mit dem C-terminalen Zinkfinger sowohl die Stabilität als auch die Spezifität der DNA-Bindung an GATA-Sequenzen. Seine zweite, wesentlich signifikantere Aufgabe ist die spezifische Interaktion mit verschiedenen anderen Proteinen (Kowalski *et al.*, 1999).

GATA-1 ist ein auf die Hämatopoese beschränkter Transkriptionsfaktor, der in hohem Maße in erythroiden, megakaryozytischen, eosinophilen und Mastzellen, in geringerem Maße in multipotenten Vorgängerzellen exprimiert wird. Das Protein ist essentiell für die Ausreifung erythroider und megakaryozytischer Zellen. Der Verlust von GATA-1 in erythroiden Zellen führt zu einem Stillstand der Entwicklung im Proerythroblastenstadium und zur Apoptose, weshalb GATA-1-defiziente Mäuse am 11,5. Tag der Gestation sterben. GATA-1-negative Megakaryozyten können ebenfalls nicht ausreifen, reagieren jedoch mit unkontrollierter Proliferation anstelle von Apoptose (Tsang *et al.*, 1998).

1.4.2 FOG-1

FOG-1 (*Friend of GATA-1*) wurde als Kofaktor von GATA-1 entdeckt (Tsang *et al.*, 1997). Inzwischen sind weitere FOG-Proteine indentifiziert worden, wie FOG-2 und das aus *Drosophila* stammende *U-shaped* (Fossett *et al.*, 2001).

1	MSRRKQSNPRQIKRSLRDMEAGEEAKAMDSSPKEQEAPDPEAPAIEEPPS	
51	PPREDVSPPAVPAPPESPEDPEDMEGQELEMRRPQDEEKEEKEEEAAMASP	
101	WSGPEELELALQDGQRCVRARLSLTEGLSWGPFYGSIQTRALSPEREPEG	
151	PAVTLMVDESCWLRMLPQVLTEEAANSEIYRKDDALWCRVTKVPSGGLL	
201	YVRLVTEPHGAPRHPVQEPVEPGGLAPVHTDIQLLPQQAGMASILATAVI	
251	NKDVPF CKDC GIWYRSERNLQA HLLLYC ASRQRAGSPVSATEEKPKEYTYP	ZnFi 1
301	NERV CPFPQC RKSCPSASSLE IHMRS H SGERPFV GLICLS AFITTKANCER	ZnFi 2/ ZnFi 3
351	HLKVH TDTLSGV CHNC GFISTTRDILY SHLVTNH MVCQPGSKGEIYSPGA	ZnFi4
401	GHPAAKLPPDSLAFQHQHSLMHSPVLPADKAPTSSGLDSKA EVTNGETR	
451	VPPQNGGSSESPAAPRTIKVEAAEEPEATRASGPGEPGPQAPSRTPSPHS	
501	PNPVRVKTELSSTPTGSSPGGELTMAGTLFLPQYVFPDAGTTTVP TAP	
551	QASEILAKMSELVHNRLQQGAGSSGAAGTPTGLFSGTKGAT CFECEITFN	ZnFi 5
601	NINNFYVHKRLYC SGRRAPEDPPTVRRPKAATGPARAPAGAAAEPDPSRS	
651	SPGPGPREEEASGTTTPEAAAGRGSEGSQSPGSSVDDAEDDPSRTL CEA	ZnFi 6
701	CNIRFSRHETYTVHKRYYC ASRHDPPIRRPPAPTTAPGPAAPALTAPPVR	
751	TRRRRRLYELPAAGAPPPAAGPAPVPVPSPTAELPSSPRPGSASAGPAP	
801	ALSPSPVPDGPIDLSKRPRRQSPDAPTALPALADYHE CTAC RVSFHSLEA	ZnFi 7
851	YLA HKKYSC PAAPLRTTAL CPYCP PNGRVVRGDLVE HLRQA H GLQVAKPAA	ZnFi 8
901	SPGAEPRTPAERAPRDPDGRAPRSPSPAPENTPSDPADQGARTPSKGPP	
951	APAPAPGGGGGHRY CRLCNIRFSS LSTFIA HKKYYC SSHAAEHVK	ZnFi 9

Abb. 1.6: Proteinsequenz von FOG-1 nach (Tsang *et al.*, 1997)
 Die Zinkfinger-Motive sind durch Unterstreichung, die relevanten Cysteine und Histidine durch Fettdruck hervorgehoben
 ZnFi: Zinkfinger

FOG-1 wird während der embryonalen und der hämatopoetischen Zellentwicklung mit GATA-1 koexprimiert. Es kooperiert mit diesem Transkriptionsfaktor bei der Steuerung der erythroiden und der megakaryozytischen Zellentwicklung durch die gemeinsame Aktivierung des Hämatopoese-spezifischen p45 nf-e2-Gens (Tsang *et al.*, 1997). FOG-1-defiziente

Mäuse sterben *in utero* nach 10,5 – 12,5 Tagen an schwerer Anämie. Die Eliminierung von FOG-1 führt bei den Erythrozyten zu einem partiellen Stillstand der Entwicklung, anders als bei fehlendem GATA-1 jedoch zum völligen Abbruch der megakaryozytischen Linie. Es wird vermutet, daß die Aufgaben von FOG-1 bei der Kontrolle der Zelldifferenzierung nicht ausschließlich mit denen von GATA-1 gekoppelt sind (Tsang *et al.*, 1998).

FOG-1 ist wie GATA-1 ein Zinkfinger-Protein mit jedoch neun Zinkfingern, unter denen sowohl der „klassische“ Typus Cys-Cys:His-His (Zinkfinger 2, 3, 4 und 8) als auch der ungewöhnliche Typus Cys-Cys:His-Cys (Zinkfinger 1, 5, 6, 7 und 9) vertreten sind (siehe Abbildung 1.6).

Der N-terminale Zinkfinger von GATA-1 interagiert mit FOG-1. Der sechste Zinkfinger von FOG-1 wurde als primärer Wechselwirkungspartner des N-terminalen Zinkfingers von GATA-1 identifiziert, und es wurde gezeigt, daß beide Zinkfinger allein für die Interaktion der beiden Proteine ausreichen (Kowalski *et al.*, 1999). Zusätzlich können die Zinkfinger 1, 5 und 9 an GATA 1 binden, wobei der Zinkfinger 5 eine deutlich geringere Affinität zeigt als die übrigen. Die Zinkfinger 2,3,4,7 und 8 scheinen hingegen nicht mit GATA-1 zu interagieren.

1.4.3 Die Rolle von GATA-1 und FOG-1 bei der Zelldifferenzierung

Daß die Interaktion von GATA-1 und FOG-1 für die erythroide und megakaryozytische Ausreifung essentiell ist, konnte kürzlich mit einem pathologischen Befund belegt werden. Eine Frau, die an leichter Thrombozytopenie litt, bekam zwei Söhne, die während der Schwangerschaft an schwerer Anämie litten und *in utero* Bluttransfusionen benötigten. Sie waren nach der Geburt anämisch und litten an schwerer Thrombozytopenie. Sie zeigten Anomalien in ihrer erythroiden Zelllinie und einen Mangel an Blutplättchen und abnorme Entwicklung der Zelllinien im Knochenmark. Da die Jungen Halbgeschwister waren und drei asymptotische Schwestern hatten, wurde ein X-chromosomaler Gendefekt vermutet. Tatsächlich stellte sich heraus, daß beide Jungen in ihrem auf dem X-Chromosom lokalisierten *gata-1*-Gen eine Punktmutation trugen, die im N-terminalen Zinkfinger zu einem Aminosäureaustausch führt, wodurch dieser die Fähigkeit verliert, an FOG-1 zu binden. Die Stabilität der Bindung von GATA-1 an seine DNA-Erkennungssequenz wird dabei nicht verringert. Die Mutation inhibiert die Interaktion zwischen GATA-1 und FOG-1, was zu der Störung der Differenzierung sowohl der erythroiden als auch der megakaryozytischen Zelllinie führt. Die Mutter war in

bezug auf diese Mutation heterozygot und zeigte weniger schwere Symptome. Dieser Befund liefert den ersten *in vivo*-Beweis für eine GATA-1/FOG-1 Interaktion und deren essentielle Bedeutung für die normale Hämatopoese im Menschen (Nichols *et al.*, 2000).

Auf welche Weise GATA-1 und FOG-1 in die Steuerung der hämatopoetischen Differenzierung eingreifen, ist unbekannt. Eindeutig ist jedoch, daß beide Faktoren essentiell für die Differenzierung sind. Beispielsweise bildet das Genprodukt ihres gemeinsamen Zielgens p45 nf-e2 eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF-E2, der ein essentieller Regulator

der Freisetzung von Blutplättchen ist. Außerdem zeigt der frühzeitige Abbruch der megakaryozytischen Linie in FOG-1-defizienten Mäusen, daß FOG-1 zunächst eine von GATA-1 unabhängige Funktion in einem frühen Stadium der megakaryozytischen Entwicklung ausübt, bevor es dann zu einem späteren Zeitpunkt der zellulären Reifung und der Thrombopoese mit GATA-1 kooperiert. Weitere beteiligte Faktoren konnten identifiziert werden. Shivdasani hat darauf aufbauend ein Modell zur Differenzierung von Megakaryozyten vorgeschlagen. Dies ist in Abbildung 1.7 schematisch dargestellt (Shivdasani, 2001).

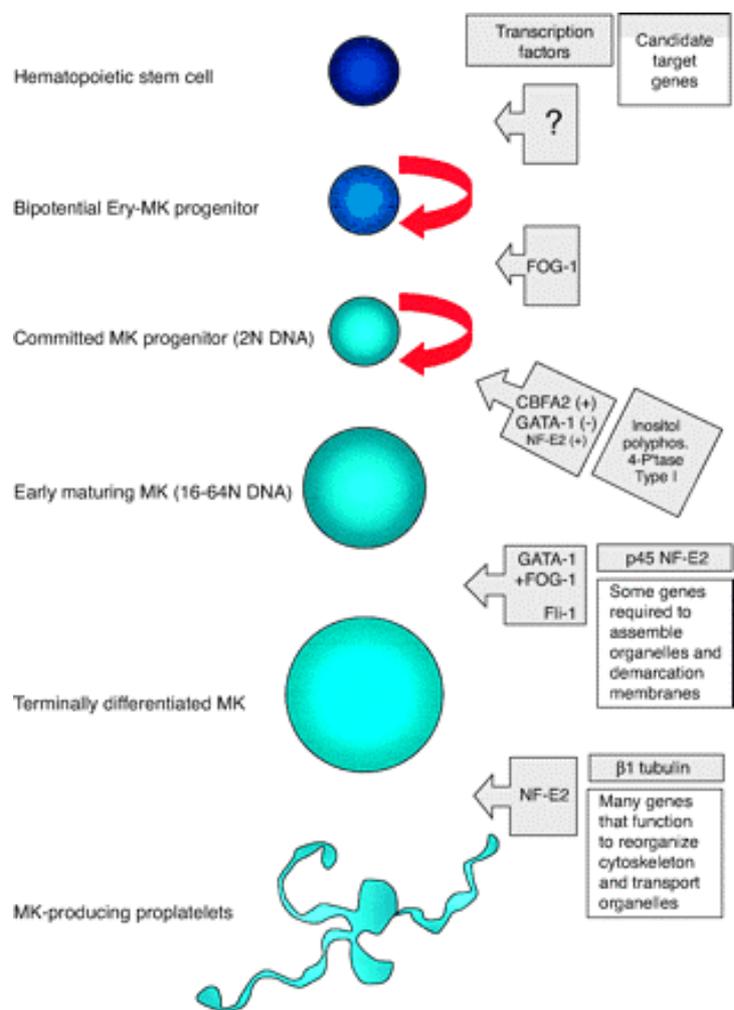


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der megakaryozytischen Differenzierung, mit bekannten oder vermuteten Transkriptionsfaktoren (linke Reihe) und Zielgenen (rechte Reihe), entnommen aus (Shivdasani, 2001)

1.4.4 Möglicher Antagonismus zwischen c-Myb und GATA-1

Sowohl c-Myb als auch GATA-1 sind Transkriptionsfaktoren, die die Hämatopoese steuern. Während c-Myb die Ausreifung myeloider Zellen steuert, agiert GATA-1 vornehmlich in der erythroiden Linie (siehe Abbildung 1.8).

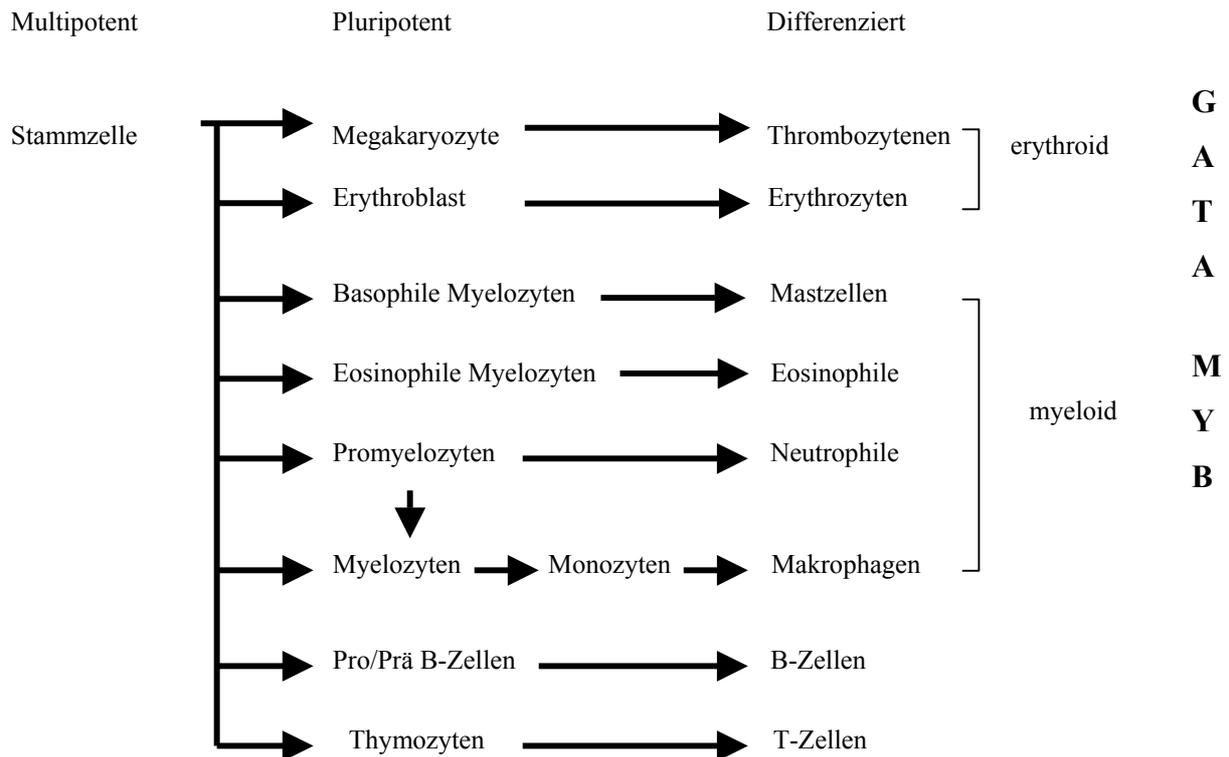


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Differenzierungswege hämatopoetischer Zellen

Verstärkte Expression von GATA-1 veranlaßt myeloide Zellen, sich entlang der megakaryozytischen Linie zu entwickeln, und myb-ets-transformierte Hühnermyeloblasten können so zur Differenzierung entlang erythroider, megakaryozytischer und eosinophiler Linien induziert werden (Tsang *et al.*, 1998). Es ist bekannt, daß CBP sowohl für c-Myb als auch für GATA-1 einen für ihre Transkriptionsaktivität essentiellen Kofaktor darstellt. Es liegt daher nahe, anzunehmen, daß c-Myb und GATA-1 antagonistisch wirken.

Eine japanische Forschergruppe (Takahashi *et al.*, 2000) hat zeigen können, daß c-Myb und GATA-1 miteinander interagieren. C-Myb bindet hierbei mit R2 und R3 seiner DNA-Bindungsdomäne an den N-terminalen Zinkfinger von GATA-1. Ferner stellte die Gruppe in Reporterassays fest, daß c-Myb die von GATA-1 induzierte Transaktivierung inhibiert, und umgekehrt. Eine c-Myb-Mutante, bei der der C-Terminus (Negativ Regulierende Domä-

ne) deletiert war (Δ c-Myb), hatte nicht denselben Effekt. Weder wirkte sie inhibierend auf die Aktivität von GATA-1, noch wurde ihre eigene Transkriptionsaktivität von GATA-1 inhibiert. Da sich dies nicht mit der Feststellung vereinbaren ließ, daß c-Myb und GATA-1 nur über die DBD von c-Myb interagieren, stellte man die Hypothese auf, daß die gegenseitige Inhibierung der beiden Proteine durch die beiderseitige Abhängigkeit von dem Kofaktor CBP und die daraus entstehende Konkurrenz zustande kommt.

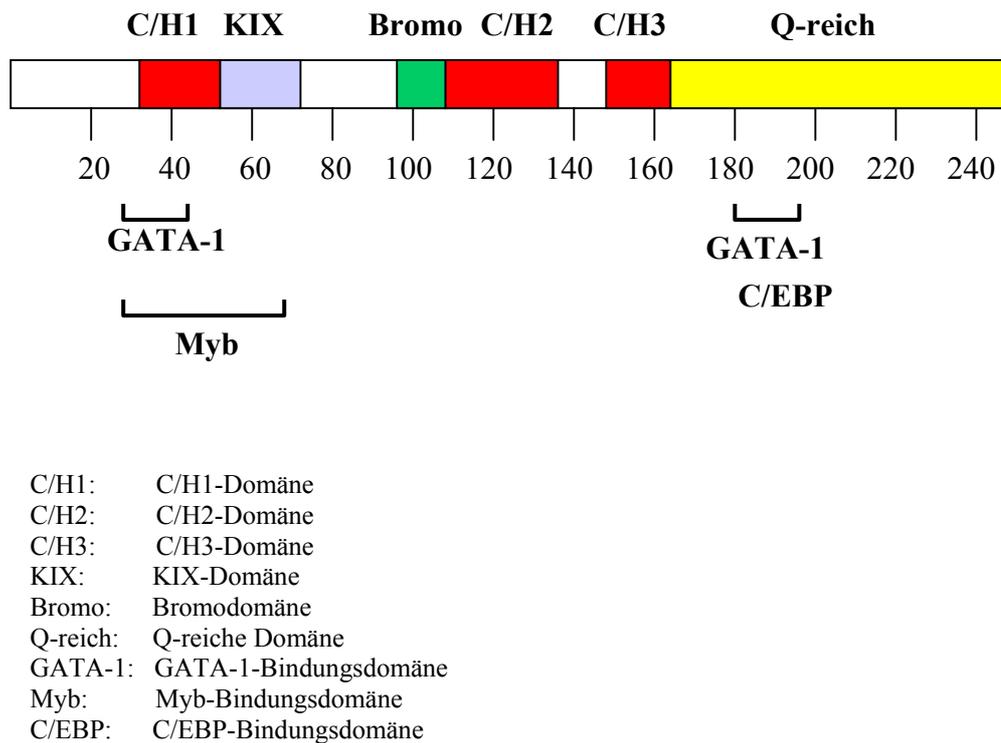


Abb. 1.9: Schematische Darstellung des Proteins CBP und seiner Bindungsstellen nach (Takahashi *et al.*, 2000)

Das Protein CBP besitzt mehrere Domänen, über die es mit anderen Proteinen interagieren kann (siehe Abbildung 1.9). GATA-1 bindet an die erste und die dritte Cystein-Histidinreiche Region (C/H1 und C/H3), c-Myb bindet an die KIX-Domäne und ebenfalls an die C/H1-Domäne, wodurch die Bindungsbereiche der beiden Proteine überlappen. Vermutlich aus diesem Grund ist es nicht möglich, einen ternären Komplex zwischen Myb, GATA-1 und CBP zu erzeugen. Ferner wurde festgestellt, daß c-Myb und GATA-1 jeweils nicht die DNA-Bindungsaktivität des anderen inhibieren. Δ c-Myb bindet lediglich an die KIX-, nicht an die C/H1-Domäne und bildet einen ternären Komplex mit den anderen beiden Partnern aus, der

sogar zu einer um das zehnfache gesteigerten Transaktivierungsaktivität von GATA-1 führt. Dies führt zu dem Schluß, daß die gegenseitige Transaktivierungsinhibierung von c-Myb und GATA-1 lediglich auf der Konkurrenz um CBP ohne die Möglichkeit eines ternären Komplexes beruht (Takahashi *et al.*, 2000).

Da alle verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien aus denselben multipotenten Vorläufern stammen, müssen die Zellen zu einem Zeitpunkt das Signal bekommen, sich aus diesem unreifen Stadium weiterzuentwickeln und entlang einer bestimmten Linie auszdifferenzieren. Das Modell von Takahashi schlägt CBP als molekularen Schalter für diesen Übergang vor. In undifferenzierten Vorläufern wird c-myb in hohem Maße exprimiert, die durch c-Myb aktivierten, für das unreife Stadium wesentlichen Gene sind angeschaltet. Gleichzeitig exprimiertes GATA-1 kann von c-Myb durch die kompetitive Bindung von CBP reprimiert werden. Sobald jedoch der Gehalt an c-Myb in den Zellen abnimmt, steigt die Transkriptionsaktivität von GATA-1 bis zu einem Punkt, an dem die Expression von GATA-1 einen Schwellenwert überschreitet, wodurch Myb reprimiert wird. Nun werden die von GATA-1 aktivierten Gene eingeschaltet, und FOG-1 übernimmt als Zelllinien-spezifischer Kofaktor dabei den Platz des ubiquitären CBP (Takahashi *et al.*, 2000).

Sowohl c-Myb als auch FOG-1 interagieren mit dem N-terminalen Zinkfinger von GATA-1. Wie unter 1.3.2.5 erwähnt, wurde im *yeast two-hybrid*-System eine Interaktion zwischen dem C-Terminus von Myb und dem 6. Zinkfinger von FOG-1, der auch als erste GATA-1-Wechselwirkungsdomäne identifiziert worden war, festgestellt. FOG-1 könnte daher ebenfalls eine Schalterfunktion besitzen, indem er z.B. die Myb-Bindung an CBP inhibiert und so die Aktivierung von GATA-1 fördert. Es stellt sich die Frage, ob die Anwesenheit von FOG-1 ohne GATA-1 eine direkte Auswirkung auf die Aktivität von c-Myb hat.

1. 5 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die biochemische Charakterisierung der Interaktion zwischen c-Myb und FOG-1. Zu diesem Zweck muß zunächst das *full-length-fog-1*-Gen isoliert und in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert werden, um mit Hilfe dieses Konstruktes die c-Myb–FOG-1-Wechselwirkungen untersuchen zu können.

2. Material und Methoden

In dieser Arbeit wurden Chemikalien (Reinheitsgrad *pro analysi*) der Firmen Amersham-Pharmacia-Biotech, AppliChem, Bayer, BioRAD, Biozym, Clontech, Fluka, GIBCO BRL, Invitrogen, Merck, Qiagen, Riedel-de-Haën, Roche, Sigma und Stratagene verwendet.

Restriktionsendonukleasen, Modifikationsenzyme und Polymerasen wurden von den Firmen Amersham-Pharmacia-Biotech, Boehringer-Mannheim, MBI-Fermentas, New England Biolabs, Promega, Qiagen und Stratagene bezogen.

Die Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen Beckman, Biozym, Boehringer Mannheim, Clontech, Eppendorf, Falcon, Gilson, Greiner, Millipore, Nunc, Pharmacia, Qiagen, Sarstedt, Schleicher & Schüll und Whatman.

Bei Klonierungen und als Primer eingesetzte Oligonukleotide wurden von der Firma MWG hergestellt, Sequenzierungen von der Firma gatc durchgeführt.

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

2.1.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Zur Vermehrung werden *Escherichia coli* in LB-Medium-Flüssigkultur im Schüttelbad oder auf LB-Agarplatten im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Zum Erzielen eines langsameren Wachstums kann auch eine niedrigere Kultivierungstemperatur (z.B. RT) gewählt werden. Die Selektion transformierter Zellen geschieht durch Zugabe eines Antibiotikums (siehe Tabelle 2.1).

Tabelle 2.1: Konzentration der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Flüssigmedien [$\mu\text{g/ml}$]	Festmedien [$\mu\text{g/ml}$]
Ampicillin	100	75
Kanamycin	30	35
Chloramphenicol	20	30
Tetracyclin	15	15

2.1.1.1.1 Medien zur Kultivierung von *Escherichia coli*

Luria Bertani-Kulturmedium (LB) für *E.coli*

10 g/l Pepton

10 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

pH 7,0 einstellen, autoklavieren

LB/ Amp -Platten für *E.coli*

10 g/l Pepton

10 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

15 g/l Agar

pH 7,0 einstellen, autoklavieren, vor dem Gießen der Platten auf 40-50°C abkühlen lassen und 75 mg/l Ampicillin dazugeben.

2.1.1.2 Chemische Transformation

Herstellung kompetenter Zellen

Um chemisch transformierbare (kompetente) Zellen zu erhalten, unterzieht man sie einer Behandlung nach der RbCl-Methode (Biolabs, 1996), entsprechend einer modifizierten Vorschrift von Hanahan (1983).

2,5 ml einer Über-Nacht-Vorkultur der zu behandelnden Zellen werden in 250 ml LB-Medium + 20 mM MgSO₄ für 2-3 h bei 37°C inkubiert. Sobald sie mit einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 den Beginn der logarithmischen Wachstumsphase erreicht haben, werden die Zellen für 5 min bei 4.000 g und bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 100 ml eiskaltem Puffer TFBI resuspendiert, fünf Minuten auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Nach Resuspension in Puffer TFBII werden die Zellen weitere 45 min auf Eis inkubiert, anschließend zu je 100 µl in Eppendorfgefäßen aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei -70°C gelagert bleiben die Zellen etwa ein Jahr kompetent.

Transformation

Das Eppendorfgefäß mit den eingefrorenen kompetenten Zellen wird nach Entnahme aus dem Tiefkühlschrank sofort auf Eis gestellt. Sind die Zellen aufgetaut, werden sie mit 100 ng bis 1 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA oder einem Ligationsansatz versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation werden sie für 90 s auf 42°C erwärmt (Hitzeschock), dann wieder auf Eis gestellt. Je nach Bedarf können sie nun direkt auf Selektionsplatten ausgestrichen oder in ein mit Antibiotikum versetztes Flüssigmedium überführt werden. Besonders bei schwierigen Ligationen oder zu erwartender geringer Transformationseffizienz ist es empfehlenswert, die Zellen vor dem Ausstreichen bzw. Animpfen zunächst mit 1 ml LB-Medium zu versetzen, 1 h bei 37°C zu inkubieren und 2 min bei 2.000 g zu zentrifugieren.

2.1.1.2.1 Puffer und Lösungen für Herstellung kompetenter *E.coli*

TFBI

30 mM	K-Acetat
100 mM	RbCl
50 mM	CaCl ₂
15 % (v/v)	Glycerin
pH 5,8 einstellen, autoklavieren	

TFBII

10 mM	MOPS
10 mM	RbCl
75 mM	CaCl ₂
15 % (v/v)	Glycerin
pH 5,8 einstellen, autoklavieren	

2.1.1.3 Proteinexpression

Für die Proteinexpression wurden in dieser Arbeit pGEX-Vektoren (für GST-Fusionsproteine) oder pQE-Vektoren (für (His)₆-Tag-Proteine) verwendet, in die zuvor das entsprechende Gen kloniert worden war. Nach der Transfektion mit dem Vektor werden TG1- oder LK111(λ)-Zellen über Nacht als Vorkultur inkubiert, aus der dann am nächsten Tag 500 ml LB/Amp-Medium angeimpft werden. Diese Expressionskultur wird unter Schütteln bei 37°C (in Sonderfällen, z.B. der Expression besonders zelltoxischer Proteine, auch bei 30°C) inkubiert. Bei Erreichen einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,8 – 1,0 werden die Zellen mit Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG) induziert, wobei die IPTG-Endkonzentration bei pGEX-Vektoren 0,1 – 0,2 mM, bei pQE-Vektoren 1 – 2 mM beträgt. Danach wird nochmal für ein bis drei Stunden bei 37°C (bzw. ggf. 30°C) inkubiert und die Zellsuspension schließlich für 10 Minuten bei 4.000 g zentrifugiert. Das Pellet bei -20°C aufbewahrt oder wie unter 2.2.7 bzw. 2.2.8 beschrieben aufgeschlossen und das Protein aufgereinigt.

Für einen Expressionstest, der in kleinerem Maßstab (20 ml oder 3 ml) durchgeführt wird, wird von der Kultur vor der Induktion (bei 3 ml Maßstab von der Vorkultur) eine 1 ml-Probe entnommen, abzentrifugiert (5 min, 5.000 g), das Pellet in LAP aufgenommen und bei 95°C für 5 – 10 min denaturiert. 2 Stunden nach der Induktion mit IPTG wird eine zweite 1 ml-Probe entnommen und wie die erste aufgearbeitet. Die beiden Proben werden auf einem SDS-PAGE analysiert; bei Expression ist in dem Gelbild der zweiten Probe im Vergleich zur ersten eine deutliche zusätzliche Bande zu sehen.

2.1.1.4 Amplifikation einer cDNA-Bibliothek

Die *Mouse Spleen* cDNA λ TriplExTM-Library wurde von der Firma Clontech bezogen, um als Template für eine PCR eingesetzt zu werden. Zur Vermehrung des Ausgangsmaterials und zur Erhaltung der cDNA-Bibliothek wurde diese zunächst amplifiziert.

1. Ausplattieren der Wirts-Zellkultur

Der *E.coli* Stamm XL1-Blue wurde als Glycerinkultur in LB-Medium mit 25% Glycerin geliefert und kann in dieser Form mindestens für 1 Jahr bei -70°C aufbewahrt werden. Um die gefrorenen Zellen wieder einsatzfähig zu machen, wird eine geringe Menge ($\sim 5 \mu\text{l}$) dieser Vorratskultur auf einer Tetracyclin enthaltenden LB-Platte ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert, danach mit Parafilm verschlossen und für maximal 2 Wochen bei 4°C aufbewahrt. Zum Erhalt einer Arbeitskultur wird von dieser primären Platte eine einzelne, isolierte Kolonie gepickt und auf einer 10 mM MgSO_4 enthaltende LB/Tet-Platte ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C kann auch diese Platte mit Parafilm verschlossen für 2 Wochen bei 4°C aufbewahrt werden. Sie dient als Quelle frischer Kolonien zum Animpfen von Flüssigkulturen und zum Präparieren der nächsten Erhaltungsplatte für Arbeitskulturen. Im 2-Wochen-Abstand sollte eine Kolonie von der jeweils letzten Erhaltungsplatte auf einer neuen LB/Tet/ MgSO_4 -Erhaltungsplatte ausgestrichen werden.

2. Titration der nicht-amplifizierten Bibliothek

Durch die Bestimmung des Titors pfu/ μl (pfu: *plaque forming unit*) kann man die Zahl der unabhängigen Klone in der Bibliothek abschätzen. Eine cDNA-Bibliothek von mindestens 1×10^6 unabhängigen Klonen repräsentiert die gesamte mRNA eines eukaryontischen Genoms.

Zunächst wird eine einzelne, isolierte Kolonie von der XL1-Blue-Erhaltungsplatte gepickt und damit eine 15 ml-Kultur in LB/ MgSO_5 /Maltose-Medium angeimpft, über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert, bis die Kultur $\text{OD}_{600} = 2,0$ erreicht hat. Die Zellen werden in einem 50 ml-Falcongefäß für 5 min bei 4.300 g abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 7,5 ml 10 mM MgSO_4 -Lösung resuspendiert.

Die benötigten 90 mm-LB/ MgSO_4 -Platten müssen auf 37°C vorgewärmt werden, wobei sichergestellt werden sollte, daß die Agaroberfläche frei von Feuchtigkeitströpfchen ist. Zum

Trocknen werden die Deckel abgenommen und die Feuchtigkeitstropfen abgeschüttelt. Die Platten werden dann umgedreht und teilweise geöffnet in einem 37°C Brutschrank erwärmt. Frisch gegossene Platten, die bei RT ausgehärtet sind, benötigen 10 – 15 min, Platten, die bei 4°C gelagert wurden, benötigen 1 h zum Erwärmen. Die Platten sollten nicht übermäßig getrocknet werden.

Währenddessen werden Verdünnungen der Phagenlösung in 1 x *Lambda dilution buffer* (LDB) erstellt. Für die vorliegende Arbeit wurde die folgende Verdünnungsreihe erstellt:

1 : 1
1: 10
1: 100
1: 1.000
1: 10.000

Die folgenden Schritte werden jeweils für jede Verdünnung durchgeführt.

1 µl der Phagenverdünnung (bei 1:1 direkt aus der cDNA-Bibliothek) werden zu 200 µl der XL1-Blue Über-Nacht-Kultur gegeben und für 10 – 25 min bei 37°C inkubiert, um dem Phagen Gelegenheit zur Adsorption zu geben. Dann werden 2 ml geschmolzener LB/MgSO₄-Top Agar hinzugegeben. Die Temperatur darf 45°C nicht überschreiten, um ein Absterben der Bakterien zu verhindern. Nach schnellem Durchmischen mittels Invertieren des Gefäßes wird der Top Agar sofort auf die vorgewärmte 90 mm-LB/MgSO₄-Platte gegossen und durch rasches Drehen der Platte auf dem Drehteller gleichmäßig verteilt.

Die Platten werden zum Abkühlen und Aushärten des Top Agars für 10 min bei RT stehengelassen, dann umgedreht bei 37°C für 6 – 18 h inkubiert, wobei in Abständen überprüft werden sollte, ob sich bereits Plaques entwickelt haben. Die Inkubation kann durch Lagerung bei 4°C über Nacht unterbrochen und am nächsten Tag wieder aufgenommen werden. Auch anschließend können die Platten bis zum Auszählen bei 4°C gelagert werden.

Nach dem Auszählen der Plaques kann der Titer der Phagen nach folgender Formel ermittelt werden:

$$\text{pfu/ml} = \frac{\text{Zahl der Plaques} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^3 \text{ µl/ml}}{\text{µl ausplattierte verdünnte Phagen}}$$

3. Amplifikation der Bibliothek

Die Anzahl der benötigten Platten ist abhängig von der Anzahl der unabhängigen Klone, die in der zu amplifizierenden Bibliothek vorliegen. Im λ TriplEx *Library* Handbuch der Firma Clontech wird empfohlen, die Amplifikation auf 1×10^5 Klone (bzw. Plaques) pro 150 mm-Platte auszurichten. Dementsprechend benötigt eine Bibliothek von 1×10^6 Klonen 10 Platten. λ TriplEx Plaques sind mit ca. 0,5 mm Durchmesser relativ klein.

Zunächst wird mit einer einzelnen, isolierten Kolonie von der XL1-Blue-Erhaltungsplatte eine 15 ml Kultur in LB/MgSO₄/Altose-Medium angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert, bei Erreichen einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 2,0 abzentrifugiert (5 min, 4.300 g) und das Zellpellet in 7,5 ml 10 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert.

Die 150 mm LB/MgSO₄-Agarplatten werden wie unter 2. vorbereitet und vorgewärmt.

Dann werden in 5 ml Reaktionsröhrchen je 500 μ l der XL1-Blue-Über-Nacht-Kultur mit jeweils genügend verdünnter Phagenlösung vermischt, um 1×10^5 Plaques pro Platte zu erhalten und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden je 4,5 ml geschmolzener LB/MgSO₄ Top Agar, dessen Temperatur 45°C nicht überschreiten sollte, in jedes Gefäß gegeben, schnell mit der Bakterien/Phagen-Lösung vermischt, sofort auf die vorgewärmten Agarplatten gegossen und durch rasches Drehen der Platte auf dem Drehteller oder Schwenken gleichmäßig verteilt.

Nach 10-minütigem Abkühlen und Erhärten des Top Agars werden die Platten umgedreht für 6 – 18 h bei 37°C inkubiert, bis die Plaques nahezu konfluent sind. Dann werden je 12 ml 1 x LDB auf jede Platte gegeben und über Nacht bei 4°C gelagert.

Am nächsten Tag werden die Platten für 1 h bei RT auf einem ebenen Schüttler mit ~50 UpM inkubiert. Anschließend wird die Flüssigkeit von allen Platten in ein steriles Becherglas gegossen und so das vereinigte λ Phagen-Lysat gewonnen.

Um das Lysat von Zelltrümmern zu reinigen und eventuell noch intakte Zellen zu lysieren, wird die Flüssigkeit gut gemischt und auf 50 ml Falcon-Reaktionsgefäße verteilt, je 10 ml Chloroform pro Gefäß hinzugegeben, die Gefäße verschlossen und 2 min geschüttelt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 5.000 g werden die Überstände in neue sterile 50 ml-Gefäße dekantiert und können nach Bestimmung des Titers (s.u.) fest verschlossen bis zu sechs Monate bei 4°C aufbewahrt werden. Für eine längere Aufbewahrungsdauer (bis zu einem Jahr) wird das Lysat in 1 ml-Aliquots aufgeteilt, mit 7% DMSO versetzt und bei -70°C eingefroren. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

4. Titration der amplifizierten Bibliothek

Die Vorbereitung der XL1-Blue-Zellen erfolgt wie unter 2. beschrieben.

Es werden 4 LB/MgSO₄-Agarplatten (Durchmesser 90 mm) benötigt, die wie unter 2. beschrieben vorgewärmt und getrocknet werden.

Es werden wie folgt Verdünnungen der amplifizierten Bibliothek hergestellt.

10 µl des Lysats werden in 1 ml 1x LDB pipettiert (Verdünnung 1 = 1:100)

10 µl der Verdünnung 1 werden weitere 1 ml 1x LDB überführt (Verdünnung 2 = 1:10.000)

Danach werden wie folgt vier Gefäße vorbereitet, wobei die XL1-Blue-Über-Nacht-Kultur (s.o.) sowie die Phagen-Verdünnung 2 eingesetzt werden:

Gefäß	1x LDB	XL1-Blue Über-Nacht-Kultur	Phagen- Verdünnung 2
1	100 µl	200 µl	5 µl
2	100 µl	200 µl	10 ml
3	100 µl	200 µl	20 µl
4 (Kontrolle)	100 µl	200 µl	0 µl

Die Gefäße werden für 15 min bei 37°C inkubiert, dann wird je 3 ml geschmolzener LB/MgSO₄-Top Agar (Max. 45°C) hinzugegeben, schnell mit der Bakterien/Phagen-Lösung vermischt, sofort auf je eine der LB/MgSO₄-Agarplatten gegossen und durch rasches Drehen der Platte auf dem Drehteller gleichmäßig verteilt. Nach 10-minütiger Abkühlung und Aushärtung des Top Agars werden die Platten umgedreht für mindestens 6 – 7 h bei 37°C inkubiert, bis die Plaques sichtbar werden.

Nach dem Auszählen der Plaques kann der Titer der amplifizierten Bibliothek gemäß der unter 2. angegebenen Formel bestimmt werden, wobei in diesem Fall der Verdünnungsfaktor 1×10^4 beträgt. Eine erfolgreich amplifizierte Bibliothek sollte einen sehr hohen Titer ($\sim 10^9$ pfu/ml) aufweisen.

2.1.1.4.1 Medien zur Kultivierung des *E.coli*-Stammes XL1-Blue

LB-Medium und LB-Agarplatten:

Siehe 2.1.1.1.1 (ohne Zugabe von Ampicillin).

LB/ Tet-Platten für XL1-Blue

LB-Medium mit 15 g/l Agar versehen, autoklavieren, auf 50°C abkühlen lassen und 15 mg/l Tetracyclin dazugeben, bevor die Platten gegossen werden.

LB/MgSO₄-Medium und -Agarplatten

Zu 1 Liter LB-Medium bzw. LB-Agar vor dem Autoklavieren 10 ml 1 M MgSO₄ zugeben.

LB/MgSO₄/Maltose-Medium

Lb/MgSO₄-Medium wie oben beschrieben herstellen. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C 10 ml einer 20%igen Maltose-Stammlösung .

LB/MgSO₄-Top Agar

Zu 1 Liter LB/MgSO₄-Medium 7,2 g Agar hinzufügen und autoklavieren. Kann bei 4°C gelagert werden.

2.1.1.4.2 Puffer für die Amplifizierung und Titration der cDNA-Bibliothek

10 x Lambda Dilution Buffer (LDB)

	Endkonzentration	Für 1 Liter Lösung einsetzen
NaCl	1,0 M	58,3 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 M	24,65 g
Tris/HCl (pH 7,5)	0,35 M	350,0 ml einer 1 M Lösung
H ₂ O	<i>ad</i> 1 L	

Autoklavieren und bei 4°C lagern.

1 x LDB

100 ml 10x LDB
 5 ml 2% Gelatine (0,01 % Endkonzentration)
ad 1L H₂O

Autoklavieren und bei 4°C lagern

Die 0,01% Gelatine stabilisiert den Bibliotheks-Titer bei Lagerung über einen längeren Zeitraum. Bei Verdünnung des Phagen für eine sofortige Titer-Bestimmung ist ihr Zusatz optional.

2.1.2 Verwendete Bakterienstämme

Die im Folgenden beschriebenen *Escherichia coli*-Stämme wurden für Arbeiten mit Plasmid-DNA eingesetzt. Es handelt sich um K12-Sicherheitsstämme.

TG1

Genotyp: K12, $\Delta(lac-pro)$, *supE*, *thi*, *hsd* Δ 5/F', *tra* Δ 36, *proA*⁺ *B*⁺, *lacI*^q, *lac Z* Δ M15.

Escherichia coli TG1 wurde zur Plasmid-Amplifikation und bei Expressionsversuchen eingesetzt.

LK111(λ)

Genotyp: $r_K^- m_K^-$, *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *tonA21*, *supE44*, *lacI^q* Z Δ M15, Hfr, λ^+ .

Escherichia coli LK111(λ) wurde zur Plasmid-Amplifikation und bei Expressionsversuchen verwendet.

Top10F'

Genotyp: F' {*lacI^q*Tn10(Tet^R)}, *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*lacZ* Δ M15, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *araD139*, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, *endA1*, *nupG*

Escherichia coli Top10F' ist ein rekombinationsdefizienter Stamm, der für die stabile Replikation von *High Copy Number*-Plasmiden entwickelt wurde. Der Stamm ist *recA1* für eine erhöhte Stabilität des Inserts, *endA* für eine bessere Plasmid-Qualität bei Minipräparation und *hsdRMS*, um Spaltung durch endogene Restriktionsenzyme zu verhindern. Der *lacZ* M15 Genotyp ermöglicht *Blue/White-Screening*. Der Stamm enthält eine Tetracyclin-Resistenz und toleriert Tetracyclin in einer Konzentration von 15 μ g/ml im Medium.

Top10F' wurde zur Vermehrung pcDNA1.1/Amp-Plasmide verwendet.

XL1-Blue

Genotyp: *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*, *lac⁻*, *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*, F' *lacI^q* Z Δ M15, *proAB*, Tn10

XL1-Blue wurde zur Amplifikation der *Mouse Spleen c-DNA* λ *TriplEx-Library* verwendet.

2.1.3 Verwendete Vektoren

2.1.3.1 pGEX-Vektoren

Die pGEX-Vektoren wurden von der Firma Pharmacia für die induzierbare intrazelluläre Expression von Genen oder Genfragmenten als GST-Fusionsproteine entwickelt. Diese Proteine lassen sich über GSH-Sepharose aufreinigen, der Fusionsanteil kann mittels einer Protease (Thrombin oder Faktor X) abgespalten werden. Die Expression steht unter Kontrolle eines

tac-Promotors. Das Plasmid trägt ein *lac I^q*-Gen, so daß es den *lac*-Repressor produziert. Der pBR322 *Ori* ermöglicht die Replikation in *E. coli*, das Ampicillinresistenzgen die Selektion. Die Vektoren unterscheiden sich in der *Multiple Cloning Site* (MCS) und in der zu verwendenden Protease. Die in dieser Arbeit eingesetzten Vektoren pGEX-2T und pGEX-4T3 kodieren eine Thrombinschnittstelle.

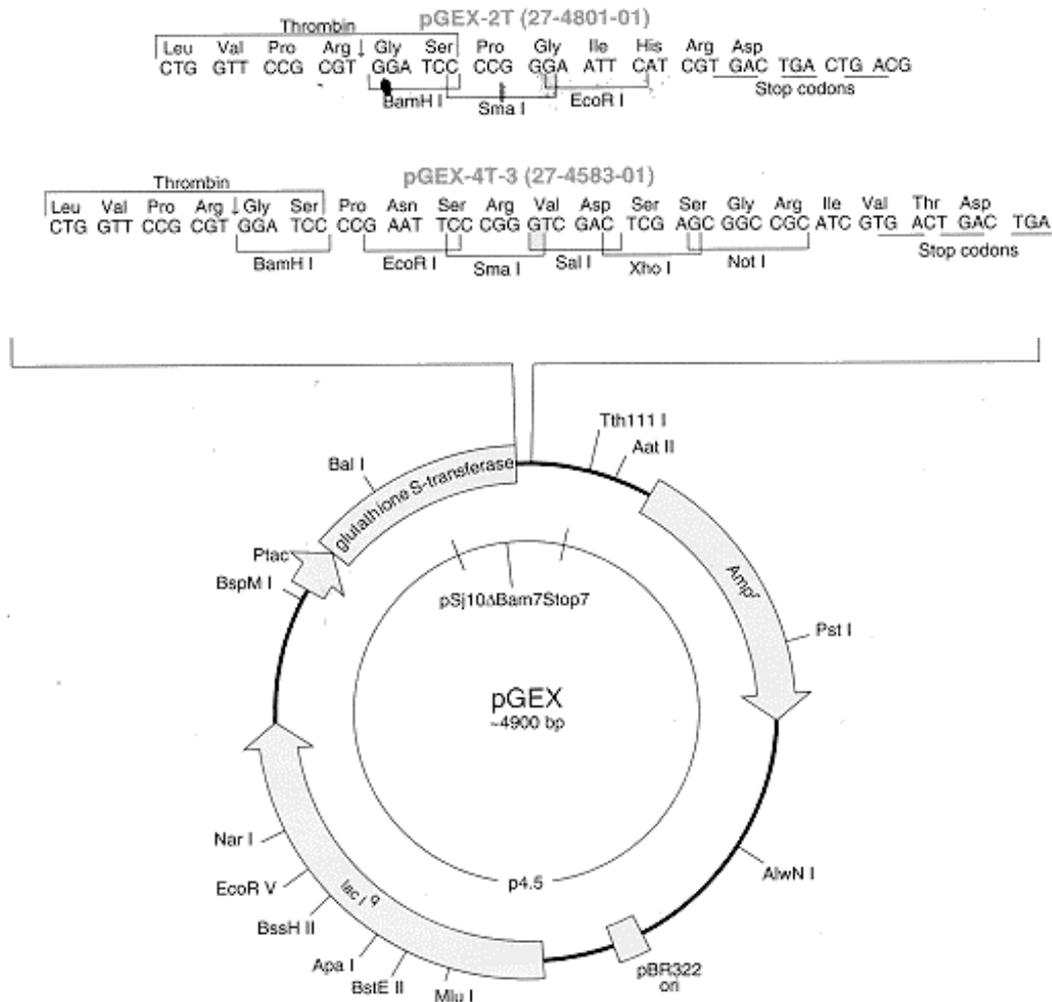


Abbildung 2.1: Plasmidkarte und MCS der pGEX-Vektoren

2.1.3.2 pQE-Vektoren

Die pQE-Vektoren stammen von der Firma Qiagen. Sie enthalten eine sechs Histidine kodierende Sequenz ((His)₆-Tag) als Fusionsanteil, der eine affinitätschromatographische Aufreinigung des exprimierten Proteins mit Ni²⁺-NTA-Agarose ermöglicht. Die Vektoren enthalten ferner einen ColE1-Ori für die Replikation in *E. coli*, ein Ampicillinresistenzgen für die Selektion sowie einen T5-Promotor, der aus dem T5-Phagen Promotor PN25 und dem *lac*-Operator besteht und mit IPTG induzierbar ist. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide pQE30, pQE31 und pQE32 besitzen die gleiche MCS und unterscheiden sich lediglich im Leseraster.

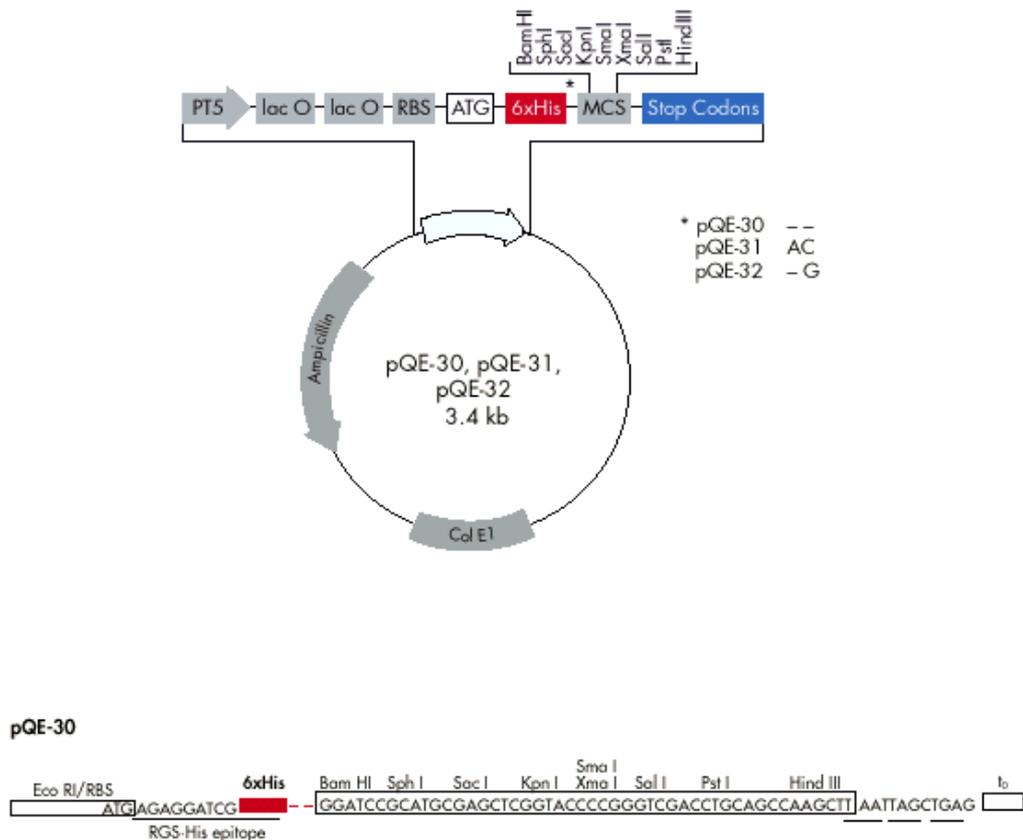


Abbildung 2.2: Plasmidkarte und MCS des pQE30-Vektors

2.2 Arbeiten mit Eukaryontischen Zellen

2.2.1 Verwendete Zelllinien

HEK 293: *Human embryonic kidney (kidney transformed)* - humane, embryonale Nierenzelllinie

Diese Zelllinie, auch als 293-Zelllinie bezeichnet, ist aus menschlichen Nierenzellen entstanden, die mit DNA von Adenovirus Typ 5 transformiert wurden. Das transformierende Gen-Fragment kodiert das virale E1A-Protein, das in die regulatorischen Prozesse der Zellen eingreift und ihren Zellzyklus verändert. Diese Zelllinie wurde bevorzugt für Reporterassays eingesetzt, da sie generell deutlich stärkere und konsistentere Luziferase-Signale erzeugte als die robusteren und daher leichter zu handhabenden COS-7-Zellen. Zur Verfügung gestellt wurde die Zelllinie von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Martin (Institut für Pharmakologie, MHH).

COS-7:

Die COS-7-Zelllinie wurde abgeleitet von CV-1, einer etablierten, von Grünen Meerkatzen stammenden Nierenzelllinie. In ihre chromosomale DNA wurde das Genom einer *Origin*-defekten Mutante des Affenvirus SV40 integriert, wodurch die Zellen das SV40-T-Antigen exprimieren. Dieses Protein reguliert sowohl die Replikation der SV40-DNA als auch die virale Genexpression. Die Deletion im *Origin* verhindert die Replikation des gesamten Virus, so daß die COS-7-Zellen kein Virus freisetzen können (Ibelgaufts, 1990).

Zur Transfektion in COS-7-Zellen werden Vektoren benötigt, die sich aus Anteilen bakterieller Plasmide, einem geeigneten Promoterbereich und dem *Ori* des SV40-Virus zusammensetzen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden COS-7-Zellen bevorzugt zur Gewinnung von Proteinen nach Transfektion eingesetzt, weil sie weniger empfindlich und daher leichter zu handhaben sind als HEK 293-Zellen. Für Reporterassays erwiesen sie sich als weniger geeignet als HEK 293-Zellen, da sie in den meisten Fällen schwächere und inkonsistentere Luziferase-Signale erzeugten.

2.2.2 Medien für die Zellkultur

DMEM : **Dulbecco's Modified Eagle Medium (High Glucose) (Gibco bzw. PAA)**
(Dulbecco and Freeman, 1959)

4500 mg/l D-Glucose
mit Natriumpyruvat
ohne L-Glutamin,

gelagert bei 4°C

Dem Medium werden vor Gebrauch je 5 ml *Penicillin/Streptomycin*-Lösung und 100 x L-Glutamin-Lösung sowie 50 ml FCS pro 500 ml hinzugefügt.

FCS : *Fetal Calf Serum*, fötales Kälberserum (Gibco bzw. PAA)

Das FCS wird vor der Verwendung durch Erhitzen auf 54°C für 30 Minuten dekomplemen-
tiert. Danach wird es in 50 ml-Portionen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.3 Puffer und Lösungen für die Zellkultur

PBS : **Phosphat Buffered Saline, steril, für die Zellkultur (Gibco)**

0,2 g/l	≅ 2,7 mM	KCl
8,0 g/l	≅ 0,14 M	NaCl
0,2 g/l	≅ 1,5 mM	KH ₂ PO ₄
1,15 g/l	≅ 8,1 mM	Na ₂ HPO ₄

pH 7,2

Penicillin/Streptomycin-Lösung (Sigma)

100 U/ml Penicillin
10 mg/ml Streptomycin
in 0,9 % NaCl-Lösung

Vom Hersteller sterilfiltriert

Die Lösung wird in 5 ml-Portionen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Trypsin/EDTA-Lösung (10 x) (Sigma)

5 g/l Trypsin

2 g/l EDTA

in 0,9 % NaCl.

Vom Hersteller sterilfiltriert

Nach einer 1:10 Verdünnung mit sterilem PBS wird die Lösung in 15 ml-Falcon-Gefäßen aliquotiert und bei -20°C gelagert. Angebrochene Aliquots werden bei 4°C gelagert.

L-Glutamin-Lösung (100 x) (Gibco)

200 mM L-Glutamin

Vom Hersteller sterilfiltriert

Die Lösung wird in 5 ml-Portionen aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.4 Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien

Die Arbeiten mit eukaryontischen Zellkulturen wurden zu Beginn dieser Arbeit an einer Sterilwerkbank Biobench der Firma Ceag Shirp, später an einer Sterilwerkbank BSB 6A der Firma Gelaire Flow Laboratories durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Begasungsbrutschrank BB16 der Firma Heraeus bei 37°C und 5 % CO₂. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit 80 cm² Grundfläche und 60 bzw. 100 mm-Petrischalen kultiviert. Das Passagieren der Zellen und Pipettieren von Flüssigkeiten erfolgte in 10 und 25 ml-Pipetten. Als Kulturgefäße und Pipetten wurden steril verpackte Plastik-Einmalverbrauchsgüter eingesetzt.

Als Kulturmedium wurde DMEM verwendet, dem vor Gebrauch 10% FCS, 5 ml L-Glutamin-Lösung und 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung zugesetzt wurden. Zum Waschen der Zellen wurde PBS verwendet. Das Medium und im Gebrauch befindliches PBS wurden bei 4°C, ungeöffnete PBS-Vorräte bei Raumtemperatur gelagert. Vor der Anwendung wurden Medium und PBS im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Für das von der Firma PAA bezogene DMEM erwies es sich als notwendig, die jeweils benötigte Menge vor dem Erwärmen in 50 ml-Falcongefäße abzufüllen, da das Medium nach wiederholtem Erwärmen und Abkühlen bei

den Zellen ein verändertes Wachstumsverhalten hervorrief. Für DMEM von der Firma Gibco wurde dieses Phänomen nicht beobachtet.

2.2.4.1 Passagieren von Zellen

Die Kultivierung von Zellen erfordert ein regelmäßiges Passagieren. Es sollte stattfinden, bevor die Zellen vollständig konfluent gewachsen sind (optimal bei ca. 80-90% Bedeckung). Nähern sich die Zellen einer 100%igen Konfluenz, kommt es bei COS-7-Zellen zu einer Kontaktinhibierung, die zum Absterben und Ablösen der Zellen führt. HEK 293-Zellen hingegen beginnen, übereinander zu wachsen und Zellhaufen zu bilden, und können so noch eine Weile weiterwachsen, sofern der Verbrauchsgrad des Mediums dies zuläßt. Die von ihnen gebildeten Zellklumpen beginnen jedoch ebenfalls bald, sich abzulösen. In diesem Stadium haben die Zellen die exponentielle Wachstumsphase verlassen und benötigen nach dem Passagieren eine Weile, um wieder in sie einzutreten.

Beim Passagieren wird das Medium dekantiert und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Nach erneutem Dekantieren der Flüssigkeit werden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 30 s (HEK 293) bis mehrere Minuten (COS-7) inkubiert, bis sie sich durch Klopfen vom Boden der Zellkulturflasche lösen lassen. Zu lange Einwirkzeiten der Trypsin/EDTA-Lösung führt zum vermehrten Absterben von Zellen, daher sollten die Zellen so rasch wie möglich abgelöst werden. HEK 293-Zellen sind empfindlicher und lösen sich schneller vom Boden ab als die robusteren COS-7-Zellen, die eine deutlich höhere Adhärenz zeigen und daher eine längere Einwirkzeit der Trypsin/EDTA-Lösung benötigen, bevor sie sich durch Klopfen der Flasche ablösen lassen. Unmittelbar nach dem Ablösen werden 8 ml Medium zugegeben und der Boden der Zellkulturflasche mehrfach damit gespült. Anschließend wird die Zellsuspension mehrere Male in der Pipette aufgezogen, um so ein gründlicheres Resuspendieren der Zellen und Auflösen von Zellklumpen zu erreichen. Mit 1 bis 2 ml dieser Zellsuspension wurde dann eine neue Kulturflasche angeimpft, wobei 20 ml frisches Medium zugegeben wurde. Die auszusähende Menge wurde durch Abschätzen der Zelldichte der Vorgängerkultur nach Augenmaß entschieden. Die Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage im Verhältnis 1:5 bis 1:6 passagiert. Wenn ein Abstand von 4 bis 5 Tagen zwischen zwei Passagen notwendig war, wurde 1 ml Zellsuspension ausgesät.

2.2.4.2 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wird eine Probe der Zellsuspension entnommen und vor dem Auftropfen auf eine Neubauer-Zählkammer im Verhältnis 1:1 mit einer 0,4% Trypanblaulösung vermischt. Dieser Farbstoff dringt in die Zellen ein, wird jedoch von lebenden Zellen wieder abgebaut oder ausgeschleust und ermöglicht es so, sie von den toten zu unterscheiden, die unter dem Lichtmikroskop durch ihre blaue Färbung zu erkennen sind. Bei der Zählung wird die Zellzahl in den acht großen Quadraten der Zählkammer bestimmt und der Mittelwert gebildet. Ein großes Quadrat enthält ein Flüssigkeitsvolumen von 0,1 µl. Demnach ergibt sich die Zellzahl pro ml Zellsuspension unter Berücksichtigung der Verdünnung gemäß:

$$\text{Zählwert} \times 2 \times 10^{-4}.$$

Dieses Verfahren wurde vor allem zur Bestimmung der Zellsuspensionsmenge, die zur Aussaat von Zellen in Kulturschalen für Transfektionen benötigt wurde, angewandt.

2.2.4.3 Lagerung von Zellen

Nach häufigem Passagieren kann es zu Veränderungen im Wachstumsverhalten und der Morphologie von eukaryontischen Zellen kommen, so daß die durch sie gewonnenen Daten nicht mehr zuverlässig sind. Daher sollte die Zellkultur bei Erreichen hoher Passagenzahlen, insbesondere bei auffälliger Veränderung der Zellen, durch frische Zellen erneuert werden. Auch bei Kontamination der Zellen durch Bakterien oder Pilze, was selbst bei sorgfältigem Arbeiten nicht auszuschließen ist, können die Zellen nicht weiterverwendet werden und müssen durch frische, unkontaminierte ersetzt werden. Daher ist es notwendig, sich einen Vorrat an tiefgefrorenen Zellen geringer Passagenzahl und Kontaminationswahrscheinlichkeit zuzulegen, auf die man in solchen Fällen zurückgreifen kann. In flüssigem Stickstoff lassen sich eukaryontische Zellen über einen längeren Zeitraum aufbewahren. Vor dem Einfrieren bedürfen sie jedoch einer speziellen Behandlung.

1. Einfrieren

Zur Vorbereitung werden Zellen in vier Zellkulturflaschen so ausgesät, daß sie am Tag des Einfrierens eine Konfluenz von 80-90 % erreicht haben. Sie werden wie unter 2.2.4.1 beschrieben geerntet und die erhaltenen Zellsuspensionen in einem sterilen 50 ml-Falcon-Gefäß vereinigt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 15 g und 4°C wird das Medium dekantiert,

die Zellen werden in 6 ml kaltem FCS mit 10 % DMSO resuspendiert. Diese Suspension in 1 ml-Aliquots auf Kryoröhrchen verteilt. Damit die Zellen möglichst wenig DMSO aufnehmen, sollten sie während dieser Arbeitsschritte auf Eis gehalten werden. Anschließend werden die Kryoröhrchen in eine doppelwandige Styroporbox überführt, die in einem -80°C -Tiefkühlschrank plaziert wird. Auf diese Weise werden die Zellen langsam und schonend abgekühlt. Nach zwei bis drei Tagen haben sie eine Temperatur von -80°C erreicht und können nun in flüssigem Stickstoff tiefgefroren werden. Zur Kontrolle wird eins der Röhrchen wie unter 2. beschrieben direkt wieder aufgetaut, um festzustellen, ob die Zellen das Einfrieren lebend und ohne Kontamination überstanden haben.

2. Auftauen

Nachdem ein Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen wurde, müssen die Zellen schnell in der Hand oder im Wasserbad aufgetaut und dann sofort in einem sterilen Falcon-Gefäß mit 20 ml kaltem Medium gut durchmischt werden. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 15 g wird das Medium dekantiert, um auf diese Weise möglichst viel DMSO aus der Suspension zu entfernen. Die Zellen werden in weiteren 20 ml Medium aufgenommen, in eine Kulturflasche überführt und im Brutschrank inkubiert. Die Nutzung der Zellen für Transfektionen sollte erst nach ein bis zwei Passagen stattfinden.

2.2.5 Transiente Transfektionen

In Versuchen von (Scholz, 1999) hat sich gezeigt, daß das von der Firma Qiagen entwickelte *Effectene*TM-Transfektionsverfahren für die Zellen schonender ist, deutlich weniger DNA benötigt und eine höhere Transfektionseffizienz aufweist als die klassische Kalziumphosphat-Methode. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich mit *Effectene* transfiziert. Das *Effectene*-Reagenz ist ein nicht-liposomales Lipid-Transfektionsreagenz. Es wird in Verbindung mit einem *Enhancer* und einem DNA-Kondensationspuffer (Puffer EC) eingesetzt. Im ersten Schritt wird die DNA durch Zugabe des *Enhancers* kondensiert, indem die positiven *Enhancer*-Moleküle mit dem negativen Phosphatrückgrat der DNA wechselwirken. Im zweiten Schritt wird *Effectene* zugegeben, das spontan eine Micellenstruktur ausbildet und so die kondensierte DNA umschließt. Der *Effectene* - DNA-Komplex kann durch Endozytose von den Zellen aufgenommen werden. Im Kulturmedium enthaltene Antibiotika und Seren stören

die Transfektionseffizienz nicht. Die Reagenzien sind unempfindlich gegen Sauerstoff und, bei 4°C gelagert, für mindestens ein Jahr stabil. Für die Dauer der Transfektion können sie bei RT gehalten werden. Auch nach mehrmaligem Gebrauch und damit verbundenem wiederholtem Erwärmen und anschließendem Abkühlen auf Lagertemperatur wurde kein Verlust an Transfektionseffizienz bemerkt.

Ziel der Transfektionen ist häufig, in Reporter-*Assays* die Effekte einzeln oder kombiniert transfizierter Gene festzustellen und miteinander zu vergleichen. Da die Gesamtmenge eingesetzter DNA immer konstant bleibt, verringert sich bei kombinierten Transfektionen die Einsatzmenge der einzelnen Plasmide mit deren steigender Anzahl. Ferner unterliegen auch in Transfektionsreihen die Anzahl ausgesäter Zellen, das Zellwachstum und die Transfektionseffizienz einer gewissen Varianz. Um die Ergebnisse der einzelnen Transfektionen dennoch miteinander vergleichen zu können, ist eine Normierung notwendig. Hierzu wird für Reporter-*Assays* in jeder Transfektion parallel ein konstitutiv exprimiertes Protein mit transfiziert, das durch Aktivitätstest quantifiziert und als Normierungsfaktor eingesetzt werden kann. Als Reporter-*Assay* wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich das Luziferase-*Assay* angewendet, zur Normierung das β -Galaktosidase-*Assay*.

2.2.5.1 Transfektion mit *Effectene*TM

Bei den von (Scholz, 1999) durchgeführten Untersuchungen wurde auch die optimal einzusetzende Menge an *Effectene* ermittelt. Dabei wurde festgestellt, daß die im *Effectene*-Handbuch (Qiagen, 1999) empfohlenen *Effectene*-Mindestmengen für eine hohe Transfektionseffizienz ausreichend und somit aufgrund des Kostenfaktors empfehlenswert sind. Entsprechend wurde im Rahmen dieser Arbeit pro Ansatz die empfohlene Mindestmenge an *Effectene* verwendet. Bei der Transfektion von mehr als einem Plasmid wie z.B. Reporter-Genkonstrukten und den dazugehörigen Expressionsvektoren werden die Plasmide, sofern nicht anders angegeben, in gleichen Gewichtsverhältnissen eingesetzt, wobei die Gesamtmenge an DNA immer 1 bzw. 2 μ g ergibt.

Die adhären-ten Zellen werden einen Tag vor der Transfektion mit einer Zelldichte von $2 - 8 \times 10^5$ pro Schale für 60 mm-Kulturschalen, $0,5 - 2,5 \times 10^6$ Zellen pro Schale für 100 mm-Kulturschalen ausgesät. Die gewählte Menge ist abhängig vom Zelltyp und dessen Wachstumsgeschwindigkeit; HEK 293 wurden meist etwas dichter ausgesät als COS-7-Zellen. Die

optimale Konfluenz am Tag der Transfektion liegt bei 30 – 40 %. Zur Transfektion wird für eine 60 mm-Schale in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß eine Gesamtmenge von 1 µg DNA so in Puffer EC vorgelegt, daß das Endvolumen 150 µl beträgt, mit 8 µl *Enhancer* versetzt und kurz auf dem Schüttler vermischt. Nach 2 – 5 min Inkubationszeit bei RT werden 10 µl *Effectene* hinzugefügt. Der Ansatz wird auf dem Schüttler 10 s lang durchmischt und 5 – 10 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wird von den Kulturschalen das Medium abgesaugt, die Zellen vorsichtig einmal mit je 2 ml sterilem PBS gewaschen und mit je 4 ml frischem Medium versetzt. Dann wird das Transfektionsgemisch mit 1 ml Medium vermischt und vorsichtig auf die Zellen getropft. Für 100 mm-Schalen werden 2 µg Gesamtmenge DNA eingesetzt und mit dem Puffer EC auf ein Endvolumen von 300 µl gebracht, 16 µl *Enhancer* und 20 µl *Effectene* eingesetzt, 7 ml Medium in den Schalen vorgelegt und das Transfektionsgemisch vor dem Auftropfen mit 3 ml Medium versetzt.

Die Cytotoxizität des *Effectenes* ist relativ gering, daher muß der Transfektionskomplex nicht unbedingt nach einiger Zeit durch Mediumwechsel wieder entfernt werden. Bei sämtlichen Transfektionen im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch nach ca. 24 h das Medium gewechselt. Dies geschah durch Absaugen des alten Mediums, ggf. einmaligem Waschen mit PBS und Zugabe frischen Mediums. Bei HEK 293-Zellen wurde aufgrund deren Empfindlichkeit meistens auf das Waschen mit PBS verzichtet.

2.2.5.2 Ernten von Zellen

Die Zellernte erfolgt nach ca. 48 h, unabhängig von der Zelldichte, die im optimalen Fall eine Konfluenz von 90 – 95 % erreicht haben sollte. Zunächst wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 350 µl (60 mm-Schalen) bzw. 500 µl (100 mm-Schalen) Extraktionspuffer versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wird das Zellysat mit einem Zellkulturschaber gesammelt und in Eppendorfgefäße pipettiert. Durch 2-minütige Zentrifugation bei 13.000 UpM in der Tischzentrifuge wird das Lysat von Zelltrümmern geklärt. Es wird vom Bodensatz abpipettiert, in neue Eppendorfgefäße überführt und direkt für die Messungen verwendet oder bei –70°C aufbewahrt.

2.2.6 Reporter-*Assays*

2.2.6.1 β -Galaktosidase-*Assay*

Bei der Transfektion für Reporter-*Assays* wird parallel mit dem Reporter-Genkonstrukt und den zugehörigen Expressionsvektoren auch ein Expressionsvektor für β -Galaktosidase im gleichen Gewichtsverhältnis mittransfiziert. Die konstitutiv von den Zellen exprimierte β -Galaktosidase kann das Reagenz o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG) zu dem gelben Farbstoff o-Nitrophenyl hydrolysieren. Diese Reaktion wird im β -Galaktosidase-*Assay* genutzt. Anhand der kolorimetrischen Konzentrationsbestimmung des Reaktionsproduktes kann die Aktivität und somit die relative Konzentration der β -Galaktosidase im Zellysats gemessen werden. Die erhaltenen Werte werden zur Normierung der im Luziferase-*Assay* gemessenen Signale benutzt, wobei davon ausgegangen wird, daß die Transfektionseffizienz des β -Galaktosidase-Expressionsvektors der Transfektionseffizienz der anderen Plasmide entspricht.

40 μ l des Zellysats werden mit 360 μ l Z-Puffer und 100 μ l ONPG-Lösung in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gut durchmischt und bei 37°C bis zu einer deutlich erkennbaren Gelbfärbung inkubiert. Dann wird die Reaktion durch Zugabe von 250 μ l Na₂CO₃-Lösung beendet. Die Carbonat-Lösung muß dabei in der gleichen Reihenfolge und möglichst der gleichen Geschwindigkeit zugegeben werden wie zuvor die ONPG-Lösung, damit alle Proben nach der gleichen Reaktionszeit gestoppt werden. Um eine Doppelbestimmung durchführen zu können, werden 2 x 100 μ l von jedem Ansatz in einer Mikrotiterplatte im *ELISA-Reader* EL309 bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. 8 x 100 μ l Z-Puffer dienen dabei als Blindproben. Je nach Transfektionseffizienz kann die notwendige Inkubationszeit zwischen einigen Sekunden und mehreren Minuten liegen, weshalb sich die Werte einer Transfektionsreihe nur untereinander, nicht aber mit denen anderer Reihen unmittelbar vergleichen lassen.

2.2.6.2 Luziferase-*Assay*

Für diesen *Assay* wird ein Reporter-Genkonstrukt transfiziert, in dem der zu untersuchende Promotor das Gen für die *Firefly*-Luziferase kontrolliert. *Firefly*-Luziferase ist eine Mono-

oxygenase, die in Gegenwart von ATP, Luftsauerstoff und Magnesium die Oxidation von Luziferin katalysiert. Dabei entsteht ein reaktives Zwischenprodukt, das unter Emission von Licht der Wellenlänge 508 nm in seinen Grundzustand Oxyluziferin relaxiert. Diese Chemolumineszenz kann in Lumineszenzmessgeräten gemessen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierfür ein Röhrenlumet der Firma Beckman verwendet. Die erhaltene Signalstärke ist proportional zum Gehalt der Luziferase im Lysat der transfizierten Zellen und somit ein Maß für die Aktivierung des dem Luziferasegen vorgeschalteten Promotors. Auf diese Weise lassen sich für diesen Promotor spezifische Transkriptionsfaktoren und ihre Aktivierung oder Inhibierung durch andere Faktoren untersuchen.

Zur Lumineszenzmessung werden je 300 µl Meßpuffer in 5 ml-Sarstedt-Röhrchen vorgelegt. Unmittelbar vor der Messung werden 50 µl Zellysat zugegeben und das Röhrchen in den Lumaten gestellt. Das Gerät injiziert 100 µl Luziferinlösung und mißt für 10 s die Lumineszenz. Aufgrund der Schwankungen zwischen zwei Messungen ist es sinnvoll, Doppelbestimmungen durchzuführen, deren Mittelwert bei entsprechender Einstellung gleich vom Lumaten berechnet wird. Die Abweichung der Werte vom Mittelwert sollte unter 10 % betragen; bei größeren Schwankungen ist es empfehlenswert, die Messung zu wiederholen. Anschließend wird eine Normierung der Meßwerte mittels Division durch die β -Galaktosidase-Meßwerte durchgeführt.

2.2.6.3 Puffer und Lösungen für das Reportergen-Assay

2.2.6.3.1 β -Galaktosidase-Assay

Extraktionspuffer

25 mM	Tris/H ₃ PO ₄ , pH 7,8
10 %	Glycerin
2 mM	EDTA
1 %	Triton X-100

Lagerung bei Raumtemperatur. Vor Gebrauch werden 100 µl 1 M DTT-Lösung auf 10 ml Puffer zugegeben.

Z-Puffer60 mM Na_2HPO_4 40 mM NaH_2PO_4

10 mM KCl

1 mM MgSO_4

Lagerung bei Raumtemperatur. Kurz vor der Messung werden 35 μl β -Mercaptoethanol pro 10 ml Puffer zugegeben.

ONPG-Lösung4 mg/ml o-Nitrophenyl-D-pyranogalaktosid (Sigma) in ddH₂O

Die Lösung wird in 1 ml-Aliquots bei -20°C gelagert.

Na₂CO₃-Lösung1 M Na_2CO_3 in ddH₂O

Lagerung bei Raumtemperatur

2.2.6.3.2 Luziferase-Assay**ATP-Lösung**

100 mM ATP

0,2 M Tris-Base

aufbewahren bei -20°C

Luziferin-Stammlösung25 mM Luziferin in 25 mM NaOH ansetzen, in 500 μl -Aliquots bei -20°C aufbewahren.

Zum Gebrauch 1:100 mit Meßpuffer verdünnen, Gebrauchslösung ebenfalls bei -20°C lagern.

Meßpuffer

25 mM Glycylglycin
15 mM MgSO₄
vor Gebrauch wird ATP zugesetzt (Endkonzentration 5 mM)

2.2.7 Vektoren für die Zellkultur

pMim-1Luc

pMim-1Luc ist ein Reportergenkonstrukt von (Oelgeschläger, 1996), welches die *mim-1* Promotorregion und darauf folgend das Firefly-Luziferasegen enthält, so daß dieser Vektor für c-Myb-bezogene Reporterassays geeignet ist. Für die Selektion bei der Replikation in *E. coli* besitzt das Plasmid ferner ein *Ampicillin*-Resistenzgen.

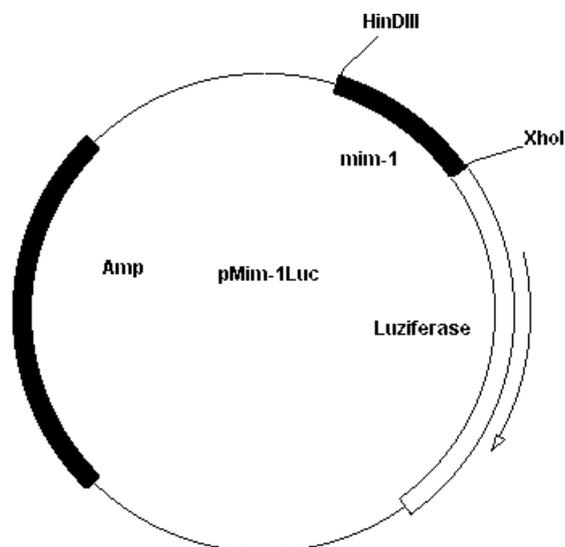


Abbildung 2.3: Plasmidkarte des pMim-1Luc-Vektors, entnommen aus (Schürmann, 2000)

pEQ176

Der eukaryontische Expressionsvektor enthält ein β -Galaktosidasegen, das von einem CMV-Promotor kontrolliert und von einem SV40-Polyadenylierungssignal gefolgt wird. Ein SV40-*Ori* ermöglicht die Replikation in Zelllinien, die das SV40 T-Antigen exprimieren. Ferner besitzt das Plasmid einen pBR322-*Ori* für die Replikation in *E.coli*, ein Ampicillinresistenzgen für die Selektion sowie einen f1-*Ori* zur Einzelstrangreplikation (Oelgeschläger, 1996). Dieser Vektor wird zur Transfektion für das β -Galaktosidase-*Assay* eingesetzt.

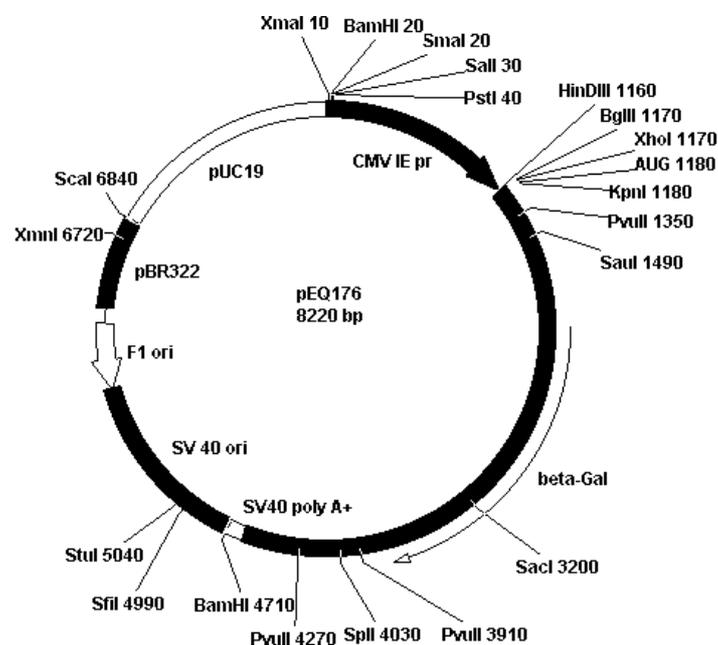


Abbildung 2.4: Plasmidkarte des pEQ176-Vektors, entnommen aus (Schürmann, 2000)

pCMV-CEBP α

Dieses Plasmid ist ein eukaryontischer Expressionsvektor für C/EBP α . Ein CMV-Promotor kontrolliert das *c/ebp α* -Gen. Das Plasmid ist in *E. coli* replizierbar, das Ampicillinresistenzgen dient hierbei der Selektion (Oelgeschläger, 1996).

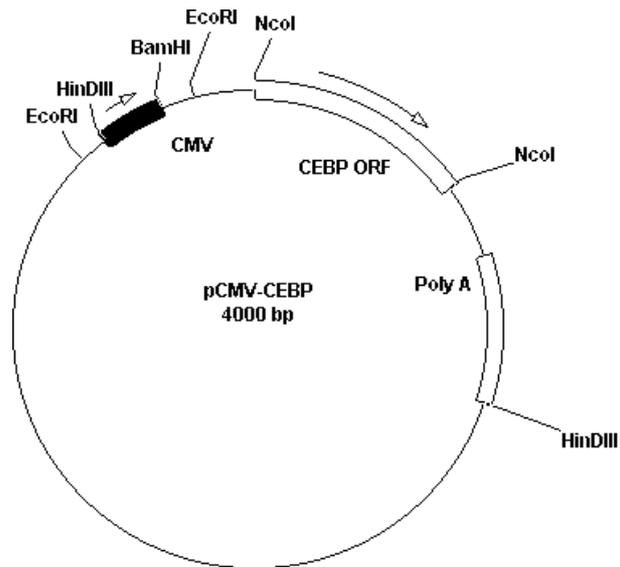


Abbildung 2.5: Plasmidkarte des pCMV-CEBP-Vektors, entnommen aus (Schürmann, 2000)

pcDNA1.1/Amp-Plasmide

Der Vektor pcDNA1.1/Amp ist ein von der Firma Invitrogen konstruierter eukaryontischer Expressionsvektor. Seine MCS wird von einem CMV-Promotor und einem SV40-Polyadenylierungssignal flankiert. Ein SV40-*Ori* ermöglicht die Replikation eukaryontischen Zellen, die das SV40-Antigen exprimieren. Das Plasmid ist durch einen ColE1-Replikationsursprung für die Vermehrung in Top10F'-Zellen ausgelegt und enthält für die Selektion hierbei ferner ein Ampicillinresistenzgen.

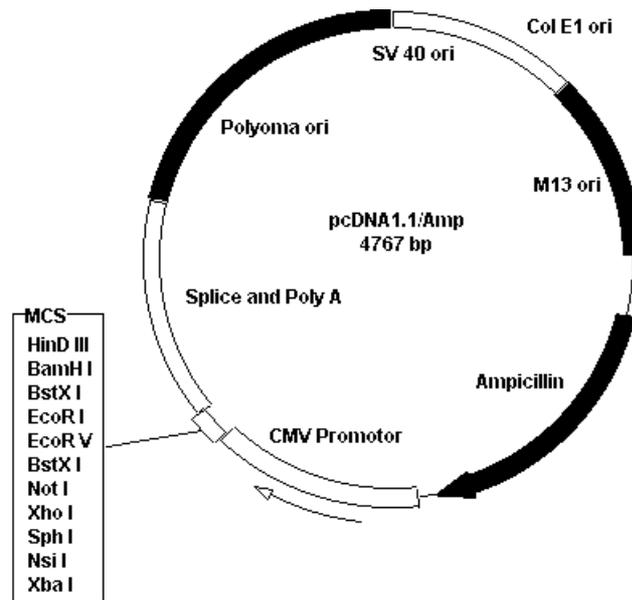


Abbildung 2.5: Plasmidkarte und MCS des pcDNA1.1/Amp-Vektors, entnommen aus (Schürmann, 2000)

pcDNAMyb

Dieser Vektor entstand durch das Einfügen des c-Myb-Gens in die MCS des pcDNA1.1/Amp-Plasmids (Scholz, 1999). Er wurde hauptsächlich für Luziferase-Assays eingesetzt. Zur Gewinnung des c-Myb-Proteins aus Eukaryontenzellen erwies er sich wegen einer zu geringen Expressionsrate als weniger geeignet, weshalb zu diesem Zweck bevorzugt der pEd.FcMyb-Vektor eingesetzt wurde.

pcDNAFOG

Das pcDNAFOG-Plasmid wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Einfügen des etwa 3.000 bp großen fog-1-Gens in die MCS des pcDNA1.1/Amp-Vektors generiert. Die Klonierung erfolgte mittels der Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *XhoI*. PcDNAFOG wurde vorwiegend für Luziferase-Assays eingesetzt.

pHAFOG

Dieser Vektor wiederum wurde durch Einfügen eines Hämagglutinin (HA)-Tags in die *BamHI*-Schnittstelle des pcDNAFOG-Plasmids vor das fog-1-Gen erhalten. Er wurde im Luciferase-Assay, vor allem aber zur Gewinnung des FOG-1-Proteins aus eukaryontischen Zellen eingesetzt, da der HA-Tag sowohl die Aufreinigung des Proteins durch Immunopräzipitation als auch seine Identifizierung im Western Blot mittels eines monoklonalen Anti-HA Antikörpers (Clone HA-7, siehe 2.3.12.2) der Firma Sigma ermöglichte.

pEd.Fc, pEd.FcMyb

Das Plasmid pEd.Fc ist ein eukaryontischer Expressionsvektor, der von Frau Dr. R. Gerady-Schahn zur Verfügung gestellt wurde. Seine MCS wird von einem SV40-Promoter und dem IgG1.Fc-Gen flankiert. Das Zielprotein wird so mit dem Fc-Anteil des humanen IgG fusioniert und kann über Protein A-Sepharose oder Immunopräzipitation aufgereinigt werden. Ferner enthält der Vektor eine Bindungsstelle für das *large T-Antigen* zur Propagierung in COS-Zellen. Eine Ampicillin-Resistenz ermöglicht die Selektion in *E. coli*. Das DHFR-Gen ermöglicht eine Selektion bei der Erzeugung stabiler Transfektanten.

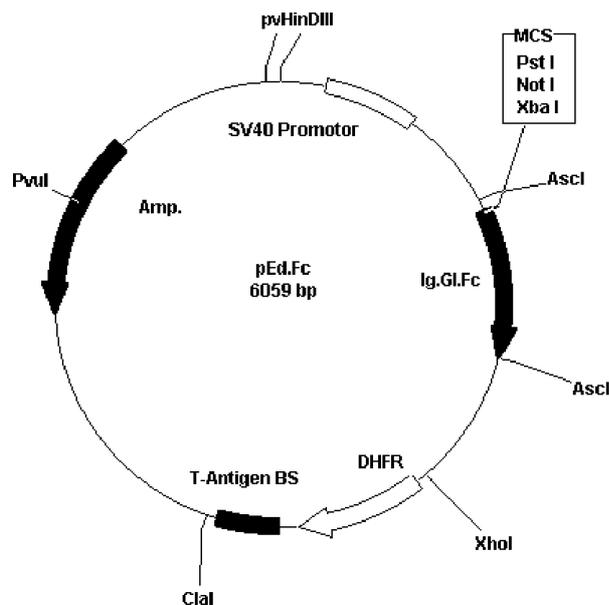


Abbildung 2.6: Plasmidkarte von pEd.Fc, nach (Sokolowski, 1998)

pEd.FcMyb wurde von R. Sokolowski (1998) durch Klonierung des *full-length* c-myb-Gens in den pEd.Fc-Vektor kloniert. Hierbei wurde zunächst ein Linker in den Vektor ligiert, der es ermöglichte, das c-myb Gen ohne Stop-Codon 5' vor das Gen für den Fc-Tag zu klonieren.

Da dieser Vektor deutlich höhere Expressionsraten für c-Myb erzielt als pcDNAMyb, wurde er für die Proteingewinnung aus eukaryontischen Zellen eingesetzt.

Vektoren des Mercury™ Pathway Profiling-Systems

Das *Mercury Pathway Profiling System* wurde von der Firma Clontech entwickelt. Es ermöglicht eine schnelle und einfache *in vivo* Untersuchung des Effekts eines Stimulus auf verschiedene Signaltransduktionswege in eukaryontischen Zellen. Die Vektoren enthalten jeweils eine spezifische *cis*-agierende DNA-Sequenz (*enhancer element*) und ein Reporter-gen, so daß die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit *Enhancer*-Elementen, durch die spezifische Signaltransduktionswege induziert werden, im Reporter-gen-Assay detektiert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde das *Mercury Pathway Profiling Luciferase System 3* eingesetzt, das speziell zur Untersuchung in der Zellproliferation und -differenzierung auftretender Signalwege konzipiert wurde. Die Vektoren enthalten die TATA-ähnliche Promotorregion (P_{TAL}) des Thymidinkinase-Promotors aus dem *Herpes Simples-Virus* (HSV-TK), mit dem die jeweilige *Enhancer*-Region fusioniert ist. Der Promotor kontrolliert das *Firefly-Luziferase*-gen, das von einem SV40-Polyadenylierungs-Signal gefolgt wird. Zur Minimierung des Hintergrundes wurde *upstream* des *Enhancers* ein synthetischer Transkriptionsblocker (TB) eingefügt. Ferner enthalten die Vektoren einen *fl-Ori* für die Replikation einzelsträngiger DNA, einen *pUC-Ori* sowie ein Ampicillinresistenzgen für ihre Amplifizierung und Selektion in *E. Coli*.

Die Vektoren werden wie unter 2.2.5.1 transfiziert. Für den dabei stattfindenden wie auch alle folgenden Mediumwechsel darf nur serumfreies Medium eingesetzt werden, um störende, durch das Serum induzierte Signale zu vermeiden. Nach zwei Tagen werden die Zellen wie beschrieben geerntet (2.2.5.2) und ein *Luziferase-Assay* sowie ein β -Galaktosidase-Assay durchgeführt.

pAP1-Luc

Dieser Vektor dient zum Nachweis der Induktion des Aktivatorproteins 1 (AP1) und des streßaktivierten Proteinkinase/Jun N-terminale Kinase (SAPK/JNK) Signal-Transduktionsweges. Hierfür enthält er vier aufeinanderfolgende Kopien des AP1-Enhancers, die mit der Promotorregion fusioniert sind.

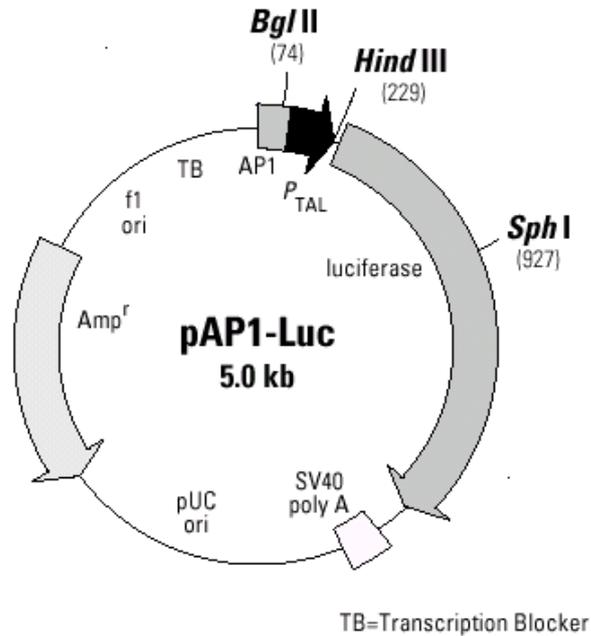


Abbildung 2.7: Plasmidkarte des pAP1-Luc-Vektors

pCRE-Luc

pCRE-Luc dient dem Nachweis der Aktivierung des cAMP-bindenden Proteins (*cAMP response element*, CRE) und des cAMP-vermittelten Signaltransduktionsweges und enthält zu diesem Zweck vor P_{Tal} drei Kopien der CRE-Bindungssequenz.

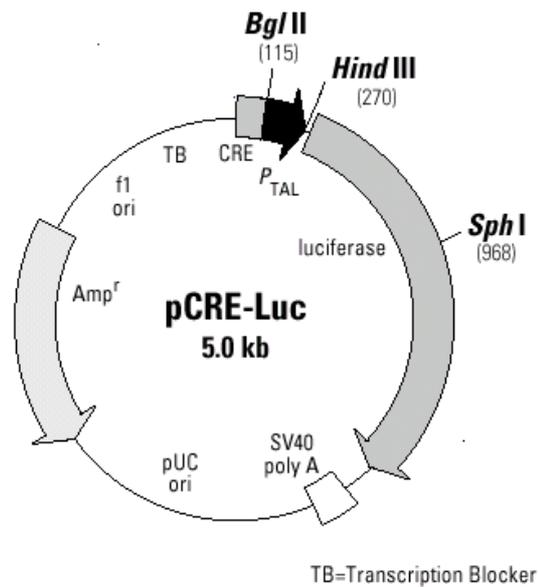


Abbildung 2.8: Plasmidkarte des pCRE-Luc-Vektors

pE2F-Luc

pE2F-Luc dient dem Nachweis der Aktivierung des durch E2F induzierten Signaltransduktionsweges und enthält vor P_{Tal} vier Kopien des E2F-Enhancer-Elementes.

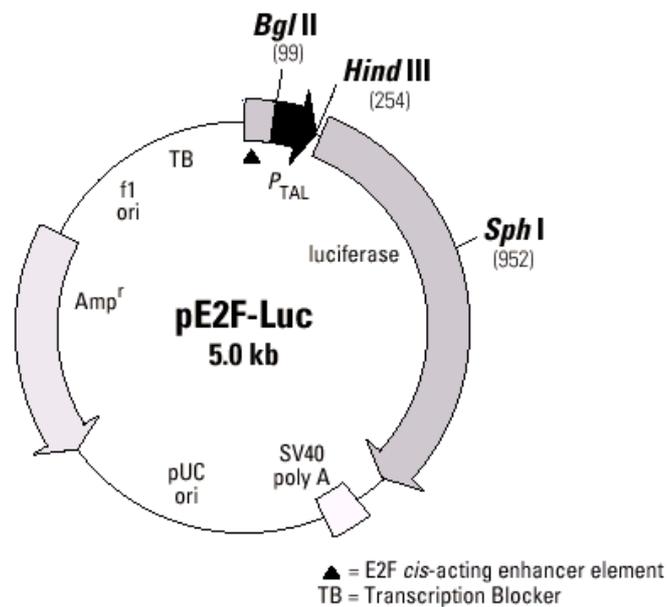


Abbildung 2.9: Plasmidkarte des pE2F-Luc-Vektors

pISRE-Luc

pISRE-Luc dient dem Nachweis der Aktivierung des durch Interferon (IFN) ausgelösten Signaltransduktionsweges (ISRE = *Interferon stimulated response element*) und enthält zu diesem Zweck vor P_{TAL} fünf Kopien der ISRE-Bindungssequenz.

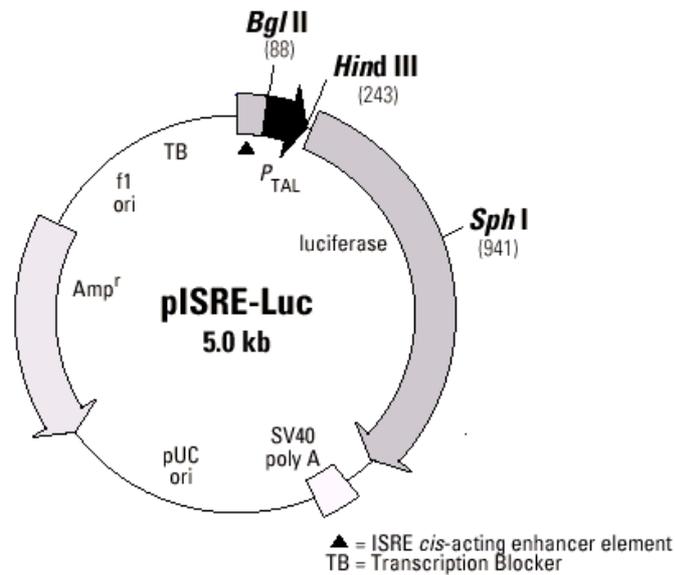


Abbildung 2.10: Plasmidkarte des pISRE-Luc-Vektors

pSRE-Luc

pSRE-Luc dient dem Nachweis der Aktivierung des *Serum Response Element* (SRE) und des Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Signaltransduktionsweges. und enthält hierfür vor P_{TAL} drei aufeinanderfolgende Kopien der SRE-Bindungssequenz.

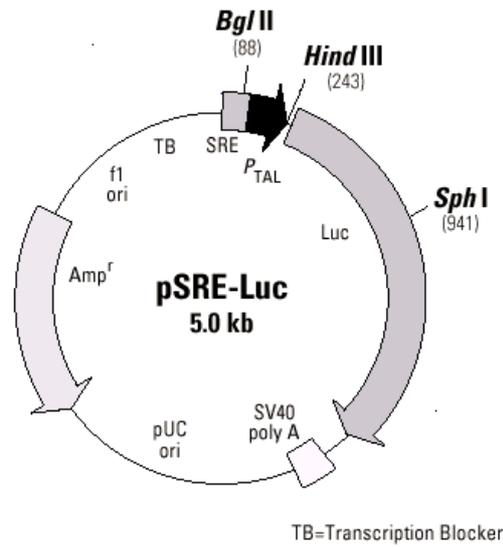
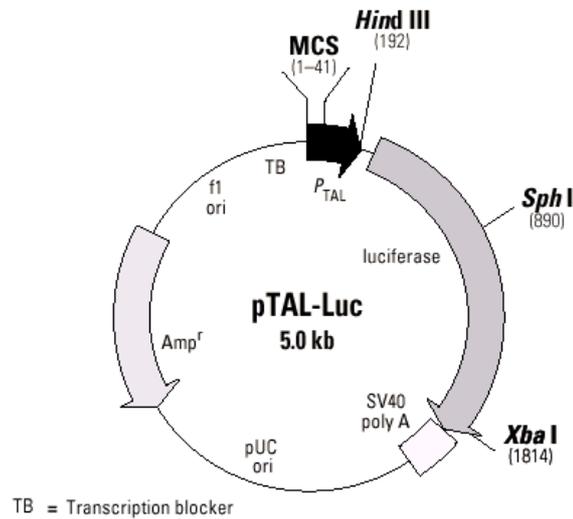


Abbildung 2.11: Plasmidkarte des pSRE-Luc-Vektors

pTAL-Luc

pTAL-Luc entspricht den anderen Vektoren ohne *Enhancer*-Sequenzen und dient als negativer Kontrollvektor. Er enthält vor P_{Tal} eine MCS, in welche andere zu testende putative *Enhancer*-Sequenzen kloniert werden können.



```

1       10      20      30      40
GGTACCGAGCTCTTACGCGTGCTAGCCCGGGCTCGAGATCT
KpnI   SacI   MluI  NheI  XmaI  XhoI  BglII
                    SmaI
    
```

Abbildung 26: Plasmidkarte und MCS des pTAL-Luc-Vektors

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von mRNA aus eukaryontischer Gesamt-RNA

Die Isolierung von mRNA wurde gemäß dem Oligotex mRNA *Spin-Column*-Protokoll (Qiagen, 1998) mit dem dazugehörigen Kit durchgeführt. Bei dem Verfahren wird die Poly-A-Sequenz der mRNA ausgenutzt, über die sie an die Säule gebunden und so von der restlichen RNA abgetrennt wird. Es wurden die im Protokoll angegebenen Mengen und Materialien für Minipräparationen eingesetzt.

Die RNA-Lösung wird zunächst in einem RNase-freiem 1,5 ml-Eppendorfgefäß mit RNase-freiem Wasser auf 250 µl aufgefüllt, mit 250 µl Puffer ORB und 15 µl Oligotex-Suspension versetzt und durch Pipettieren vermischt. Um die Sekundärstruktur der RNA aufzuheben, wird 3 min bei 70°C inkubiert. Anschließend erfolgt die Hybridisation zwischen dem Poly-A-Schwanz der mRNA und dem Oligo dT₃₀ der Oligotexpartikel durch 10-minütige Inkubation bei RT. Der Oligotex-mRNA-Komplex wird 2 min mit 14.000 UpM (Eppendorf Centrifuge 5415) abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wird in 400 µl Puffer OW2 resuspendiert, auf eine in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß platzierte *small spin column* pipettiert und 1 min mit 14.000 UpM zentrifugiert. Danach wird die Säule in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 400 µl Puffer OW2 gewaschen (1 min Zentrifugation, 14.000 UpM). Wieder wird die Säule in ein neues, RNase-freies 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Es werden 50 µl auf 70°C vorgewärmter Puffer OEB auf die Säule gegeben, der Rückstand wird durch drei- bis viermaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert, dann wird für 1 min mit 14.000 UpM zentrifugiert. Dieser Schritt wird ein zweites Mal wiederholt, die so erhaltenen Extrakte vereinigt und zu 5 x 20 µl aliquotiert.

2.3.2 Plasmidpräparation aus *Escherichia coli*

Die Firma Qiagen hat ein einfaches und schnelles System für die Plasmidpräparation aus *E. coli* entwickelt. Dabei folgt auf die modifizierte alkalischen Lyse- und Extraktionsmethode nach (Birnboim and Doly, 1979; Birnboim, 1983) die Aufreinigung der DNA über eine Anio-

enaustauscher-Säule mit anschließender Elution der DNA durch einen speziellen Puffer. Es werden abhängig von der Größe der Präparationen und der gewünschten Reinheit des Produktes verschiedene Kits angeboten, von denen im Rahmen dieser Arbeit die QIAGEN *Plasmid Midi* und *MaxiKits* sowie das *QIAprep Spin Miniprep Kit* verwendet wurden. Die einzelnen Protokolle unterscheiden sich nur wenig voneinander.

Minipräparation

Das *QIAprep Spin Miniprep Kit* wurde für die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus 1-5 ml Über-Nacht-Flüssigkulturen entwickelt. Nach Zentrifugation der Kultur für 10 min bei 3.500 g wird das Zellpellet in 250 ml Puffer P1, der RNase A enthält, resuspendiert. Für den alkalischen Zellaufschluß werden 250 µl Puffer P2 zugegeben, die Flüssigkeiten vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 350 µl Puffer N3 wird das Reaktionsgemisch neutralisiert, denaturierte Proteine, chromosomale DNA und Zelltrümmer werden gefällt. Nach 10-minütiger Zentrifugation in einer Eppendorf Zentrifuge 5415 mit 13.000 UpM wird der klare Überstand auf eine *QIAprep spin column* überführt. Der Durchlauf wird durch kurze Zentrifugation in der Eppendorf Zentrifuge beschleunigt. In diesem Schritt bindet die im Zell-Lysat enthaltene Plasmid-DNA an das Säulenmaterial. Sie wird mit 500 µl Puffer PB (optional) und 750 µl Puffer PE gewaschen. Nach einer weiteren kurzen Zentrifugation zur Entfernung von Flüssigkeitsresten wird die Plasmid-DNA mit 50-100 µl Puffer EB eluiert.

Midipräparation und Maxipräparation

Das QIAGEN *Plasmid Midi Kit* wird bei der Plasmidpurifikation aus 25 ml – 100 ml-Flüssigkulturen eingesetzt, das *Maxi Kit* für Plasmidpurifikation aus 100 ml – 500 ml-Flüssigkulturen. Midi- und Maxipräparation werden nach dem gleichen Protokoll durchgeführt, sie unterscheiden sich lediglich durch die Größe der Säule und die Volumina der eingesetzten Puffer und Lösungsmittel.

Nach Zentrifugation der Flüssigkultur für 15 min bei 6.000 g und 4°C wird das Zellpellet für eine Midipräparation in einem 50 ml-Falcongefäß in 4 ml Puffer P1 (Maxipräparation: 10 ml) resuspendiert. Die Suspension wird mit 4 ml (10 ml) Puffer P2 versetzt und nach vorsichtigem, doch gründlichem Durchmischen 5 min bei RT inkubiert. Danach werden 4 ml (10 ml) Puffer P3 hinzugegeben. Nach 15-minütiger (20-minütiger) Inkubation auf Eis wird das Reaktionsgemisch 30 min mit Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Sollte danach das Lysat noch nicht völlig klar sein, kann es zusätzlich durch einen Faltenfilter gegeben werden. Inzwischen wird eine QIAGEN-tip 100 (QIAGEN-tip 500) –Säule mit 4 ml (10 ml) Puffer QBT

äquiliibriert. Anschließend wird das klare Zellysat auf die Säule gegeben und durchlaufen gelassen. Die auf dem Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA wird mit 2 x 10 ml (2 x 30 ml) Puffer QC gewaschen und dann mit 5 ml (15 ml) Puffer QF eluiert. Zum Ausfällen der DNA wird das Eluat in einem 50 ml-Falcongefäß mit 3,5 ml (10,5 ml) Isopropanol versetzt und nach gründlichem Durchmischen 30 min mit Höchstgeschwindigkeit und bei 4°C zentrifugiert. Das erhaltene DNA-Pellet wird mit 2 ml (5 ml) 70%igem Ethanol gewaschen und 10 min mit Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Nach Abgießen der Flüssigkeit wird das DNA-Pellet an der Luft getrocknet, bis sämtliches Ethanol entfernt ist, und in 100-250 µl Puffer EB aufgenommen.

2.3.2.1 Puffer für Plasmid-DNA Präparationen aus *E.coli* (Qiagen)

Sämtliche für die Plasmidpräparation zu verwendenden Puffer sind in den entsprechenden Kits enthalten. Die Zusammensetzung der Puffer, sofern vom Hersteller angegeben, finden sich im *QIAprep Miniprep Handbook* der Firma Qiagen.

2.3.3 DNA-Aufreinigung mit dem *QIAquick Spin System*

2.3.3.1 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Für die schnelle Aufreinigung von DNA aus Reaktionsgemischen und Agarosegelen wurde von der Firma Qiagen das *QIAquick Spin System* entwickelt, zu dem auch das *QIAquick Gel Extraction Kit* gehört. Die in einer wässrigen Lösung enthaltene DNA wird hierbei an der Silikagel-Membran der *QIAquick Spin*-Säule gebunden, in einem Waschschrift gereinigt und mit einem speziellen Puffer eluiert.

Durchführung der Gel-Extraktion

Nach Auftrennung eines Reaktionsgemisches durch eine Agarosegel-Elektrophorese (siehe 2.3.7.1) und Einfärben des Gels mit Ethidiumbromid wird das gewünschte DNA-Fragment unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. In einem 2 ml-Eppendorfreaktionsgefäß wird das erhaltene Gelstück mit 300 µl Puffer QG pro 100 mg Gel versetzt und bei 50°C inkubiert, bis sich das Gel vollständig aufgelöst hat. Die Lösung wird mit 100 µl

Isopropanol pro 100 ml Gel versetzt und nach gründlichem Mischen in 750 ml-Schritten auf eine *QIAquick Spin* Säule überführt. Durch kurzes Zentrifugieren in einer Eppendorf Zentrifuge 5415 wird die Flüssigkeit durch die Säule getrieben, wobei die DNA an der Säulenmembran bindet. Nachdem die gesamte Gellösung auf die Säule appliziert wurde, kann die gebundene DNA mit 500 µl Puffer QG gewaschen werden, um Agarosereste zu entfernen (optional). Es folgen ein Waschschrift mit 750 µl Puffer PE und eine weitere Zentrifugation zur Entfernung von Flüssigkeitsresten. Dann wird die DNA mit 50 µl Puffer EB eluiert. Zum Erzielen einer höheren DNA-Konzentration im Eluat kann auch mit 30 µl Puffer EB eluiert werden, wobei die Spinsäule vor der Zentrifugation 1 min bei RT inkubiert wird.

2.3.3.1.1 Puffer für die DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Alle für die DNA-Isolierung aus Agarosegelen benötigten Puffer sind im *QIAquick Gel Extraction Kit* enthalten. Die Puffer PE und EB entsprechen den bei der Plasmid-Präparation verwendeten gleichnamigen Puffern.

2.3.3.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Das für die Aufreinigung von PCR-Produkten verwendete *QIAquick PCR Purification Kit* gehört wie das *QIAquick Gel Extraction Kit* zum *QIAquick Spin System* der Firma Qiagen. Es werden die gleichen *QIAquick* Spinsäulen und mit einer Ausnahme die gleichen Puffer verwendet.

Durchführung

Der PCR-Ansatz wird mit dem fünffachen Volumen Puffer PB vermischt, wobei ggf. vorhandenes Mineralöl zuvor nicht entfernt werden muß. Die Probe wird auf eine *QIAquick Spin*-Säule überführt. Durch kurze Zentrifugation in einer Eppendorf Zentrifuge 5415 wird die Flüssigkeit durch die Säule getrieben, wobei die in der Lösung enthaltene DNA an die Säulenmembran bindet. Durch Waschen mit 750 µl Puffer PE wird die DNA gereinigt, durch eine weitere Zentrifugation werden Flüssigkeitsreste entfernt. Dann wird wie bei der Gel-Extraktion die DNA mit 50 µl bzw. 30 µl Puffer EB eluiert.

2.3.3.2.1 Puffer für die Aufreinigung von PCR-Produkten

Alle für die Aufreinigung von PCR-Produkten benötigten Puffer sind im *QIAquick PCR Purification Kit* enthalten. Die Puffer PE und EB entsprechen den bei der Plasmid-Präparation verwendeten Puffern gleichen Namens.

2.3.4 DNA-Modifikationen

2.3.4.1 Restriktionsspaltung von DNA

Die im Rahmen dieser Arbeit für analytische und präparative Restriktionsspaltungen verwendeten Restriktionsenzyme wurden größtenteils von der Firma MBI-Fermentas, gelegentlich auch von den Firmen New England Biolabs, Amersham-Pharmacia-Biotech oder Boehringer-Mannheim bezogen. Die eingesetzten Enzyme sind unter „Durchführung und Ergebnisse“ für die jeweiligen Versuche aufgeführt.

Das Ansatzvolumen bei analytischen Restriktionsspaltungen beträgt normalerweise 10 µl. Es werden ca. 0,5-1 µg DNA, 1 µl 10 x Puffer und 5-10 U Enzym eingesetzt. Bei präparativen Ansätzen werden bis zu 10 µg DNA mit 30-50 U Enzym gespalten. Abhängig von der Konzentration der DNA kann das Ansatzvolumen zwischen 10 und 60 µl liegen, wobei eine entsprechende Menge an 10 x Puffer mit einberechnet werden muß. Das Reaktionsgemisch wird für 1-4 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur (meist 37°C) inkubiert. Anschließend wird der Ansatz mit 5-30 µl Auftragspuffer versetzt und auf einem Agarose- oder Acrylamidgel analysiert bzw. aufgetrennt. Der mit Auftragspuffer versetzte Reaktionsansatz kann bis zum Auftragen auf das Gel auch bei -20°C gelagert werden.

2.3.4.1.1 Puffer für Restriktionsenzyme

Die Firmen MBI-Fermentas, New England Biolabs, Amersham-Pharmacia-Biotech und Boehringer-Mannheim haben jeweils Puffersysteme entwickelt, die mit vier oder fünf verschiedenen Puffern die für die Funktionsfähigkeit der meisten von ihnen vertriebenen Enzyme notwendigen Bedingungen abdecken. Für einige wenige Enzyme gibt es Spezialpuffer. Die

Puffer werden in zehnfacher Konzentration geliefert und im Reaktionsansatz entsprechend verdünnt. Bei Restriktionsspaltungen mit nur einem Enzym wurde im Rahmen dieser Arbeit immer der von der Firma mitgelieferte, für das Enzym optimale Puffer verwendet. Bei Mehrfachverdaus wurde anhand der Aktivitätstabellen aller vier Firmen der für die eingesetzte Enzymkombination günstigste Puffer verwendet.

2.3.4.2 Ligation linearer DNA

Zur Ligation werden 50-150 ng des Rahmens, eines linearisierten Plasmids, eingesetzt. Das molare Verhältnis zwischen dem Rahmen und dem Insert sollte bei etwa 1 : 3 liegen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden meist zwei Ligationen mit unterschiedlichen Insertmengen parallel angesetzt. Ein weiterer Ansatz ohne Insert wurde als Blindprobe mitgeführt. Das Ansatzvolumen betrug immer 30 µl, entsprechend wurden 3 µl 10 x Ligationspuffer zugesetzt, sowie 5-10 U T4-Ligase. Puffer und Ligase wurden von der Firma MBI-Fermentas bezogen.

Der Ligationsansatz wird eine Stunde bei 37 °C, alternativ vier Stunden bei Raumtemperatur oder auch 16 Stunden bei 10°C inkubiert. Anschließend wird der gesamte Ansatz direkt zur Transformation auf kompetente *E. coli*-Zellen gegeben.

2.3.4.3 Dephosphorylierung von DNA

Besitzt der in einer Ligation eingesetzte Rahmen zwei gleiche Enden, so ist es ratsam, seine endständigen Phosphatgruppen zu entfernen, um eine Religation des Rahmens zu verhindern. Die von dem Insert mitgebrachten Phosphatgruppen reichen für eine erfolgreiche Ligation aus.

Zur Dephosphorylierung wird direkt nach der zur Öffnung des Rahmens durchgeführten Restriktionsspaltung 1 U Alkalische Phosphatase (CIAP; bezogen von der Firma MBI-Fermentas) pro 20 pmol DNA in den Reaktionsansatz gegeben. Die CIAP kann in den gängigen Restriktionspuffern arbeiten, weshalb kein zusätzlicher Aufreinigungsschritt notwendig ist. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C wird die CIAP durch 20-minütiges Erhitzen auf 85°C inaktiviert. Die DNA kann danach über ein Agarosegel aufgearbeitet werden (siehe 2.3.7.1).

2.3.5 PCR

2.3.5.1 PCR

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) lässt sich ein schnelles *Screening* von Klonen nach einer Ligation durchführen oder ein Insert für eine Ligation unter Einführung neuer Schnittstellen amplifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sie ferner bei dem Versuch eingesetzt, das *fog-1*-Gen aus einer cDNA-Bibliothek sowie aus einem Plasmid zu isolieren. Die PCR wurden im Thermocycler Primus 25 der Firma MWG-Biotech durchgeführt. Es wurden folgende Polymerasen verwendet:

- *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase (*Taq*, MBI-Fermentas), wegen relativ hoher Fehler-rate vor allem bei analytischen PCR eingesetzt.
- *ExpandTM High Fidelity* PCR-System (Boehringer Mannheim), Thermostabile DNA-Polymerase-Mischung (*Taq/ Pwo*). Durch die 3' → 5'-Exonukleaseaktivität der *Pwo*-DNA-Polymerase wird eine dreifach höhere Genauigkeit in der DNA-Synthese im Vergleich zu reiner *Taq*-Polymerase erreicht.
- *Proof Start* DNA-Polymerase (Qiagen); modifizierte Form einer rekombinanten 90 kDA DNA-Polymerase, ursprünglich aus einem neuen *Pyrococcus*-Stamm isoliert und in *E. coli* kloniert. Das Enzym besitzt eine 3' → 5'-Exonukleaseaktivität, die generell als *Proof reading*-Aktivität bezeichnet wird und durch die sie mehr als zehnmal genauer als *Taq*-Polymerase arbeitet. Sie wurde seit ihrer Verfügbarkeit (2001) vor allem bei PCR-Klonierungen eingesetzt.

Die typische Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes zeigt Tabelle 2.3.

Tabelle 2.2: Mengenangaben für PCR-Ansätze

Komponente	Analytische PCR	Präparative PCR
10 x Puffer	2,5 µl	5,0 µl
dNTPs [2 mM]	2,5 µl	7,5 µl
3'Primer [10 µM]	2,0 µl	5,0 µl
5'Primer [10 µM]	2,0 µl	5,0 µl
DNA-Polymerase [U]	2,5	5
ddH2O	ad 25 µl	ad 50 µl

Als Puffer werden die jeweils mit der Polymerase gelieferten 10 x Puffer verwendet. Bei nicht zufriedenstellenden Ergebnissen können in weiteren Versuchen durch Zugabe von 25 mM MgCl₂- oder MgSO₄-Lösung die Mg²⁺-Konzentration im Reaktionsgemisch, durch Zugabe von 5 x Q-Lösung der Firma Qiagen das Schmelzverhalten der DNA verändert werden.

Für eine analytische PCR wird dem Reaktionsgemisch eine Probe der zu untersuchenden Bakterienkolonie oder Plasmidlösung, für eine präparative PCR werden 0,01-0,1 µg DNA als *Template* zugesetzt. Ein typisches PCR-Programm wird in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3: Exemplarischer PCR-Zyklus

Arbeitsschritt	Temperatur	Dauer
Einleitende Denaturierung	94°C	5 min
—————20-40 Zyklen—————		
Denaturierung	94°C	30-60 s
<i>Annealing</i>	40-72°C	30-60 s
Elongation	72°C	60 s
—————		
Abschließender		
Elongationsschritt	72°C	3 min
Endtemperatur	4°C	∞

Eine Probe des Reaktionsgemisches wird anschließend auf einem Polyacrylamid- oder Agarosegel analysiert. Bei Weiterverwendung des Produktes wird es zunächst entsprechend 2.3.3.2 aufgereinigt.

2.3.5.2 RT-PCR

Die RT-PCR wird angewandt, um aus einer mRNA die entsprechende cDNA zu erhalten und zu amplifizieren, z.B. um das Vorhandensein oder Fehlen bestimmter RNA-*Templates* nachzuweisen oder das Niveau einer Genexpression zu bestimmen. Hierzu wird der Polymerasekettenreaktion ein Schritt vorgeschaltet, in dem mittels Reverser Transkriptase RNA in DNA umgeschrieben wird. In der vorliegenden Arbeit wurde über RT-PCR versucht, das fog-1-Gen aus einer mRNA-Bibliothek zu isolieren und als DNA zu erhalten. Hierzu wurde eine aus der Milz der Maus gewonnene mRNA-Bibliothek gewählt, da FOG-1 als hämatopoetischer Transkriptionsfaktor in der Milz stark exprimiert wird. Für die Durchführung der RT-PCR und der PCR wurde das *TitanTM One Tube RT-PCR System* der Firma Boehringer Mannheim verwendet, das es ermöglicht, beide Teilreaktionen in einem Schritt durchzuführen .

Das Reaktionskit enthält folgende Komponenten:

- Einen Enzym-Mix aus Reverser Transkriptase AMV und *Expand High Fidelity-Enzym Mix*, bestehend aus den DNA-Polymerasen Taq und Pwo
- 5 x RT-PCR Reaktionspuffer mit 7.5 mM MgCl₂ und DMSO
- MgCl₂-Lösung, 25 mM
- Dithiothreitolösung, 100 mM

Das *TitanTM One Tube RT-PCR System* ist bei -20°C gelagert stabil.

Durchführung

Die Komponenten werden aufgetaut, und auf Eis gestellt, vor der Verwendung kurz geschüttelt und anzentrifugiert. Die Reaktionskomponenten für Mastermix 1 und Mastermix 2 (siehe Tabelle 2.4) werden in zwei getrennten Reaktionsgefäßen angesetzt, wobei die Gefäße auf Eis zu halten sind. Jeweils 25 µl von Mastermix 1 und Mastermix 2 werden in ein auf Eis stehendes 0,2 ml PCR-Gefäß gegeben, sorgfältig gemischt und kurz zentrifugiert. Für den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Thermocycler ist eine Übersichtung mit Mineralöl nicht notwendig. Die Probe wird in den bereits auf 50°C äquilibrierten Thermocycler gestellt und für 30 min inkubiert. Direkt anschließend wird gemäß dem entsprechenden PCR-Protokoll (siehe 2.3.5.1) fortgefahren. Dabei ist zu beachten, daß die Elongationstemperatur 68°C statt 72°C betragen muß.

Beim Arbeiten mit RNA sollten immer Handschuhe getragen werden, um Kontamination mit RNase zu vermeiden.

Tabelle 2.4: Reaktionsgemische für die RT-PCR gemäß *Titan™ One Tube RT-PCR System*-Protokoll

Komponente	Volumen	Endkonzentration in der RT-PCR
Mastermix 1:		
Steriles ddH ₂ O	bis zu 25 ml	
dNTP's, 10 mM	1 µl	0,2 mM
5'-Primer, 10 mM	1 µl	0,4 mM
3'-Primer, 10 mM	1 µl	0,4 mM
Template RNA	x µl	1 µg – 1 pg RNA
DTT-Lösung (100 mM),	x µl	5 mM
RNAse-Inhibitor (40 U/µl)*	x µl	5 – 10 U
Total	25 µl	
Mastermix 2:		
Steriles, ddH ₂ O	Bis zu 25 ml	
5 x RT-PCR Puffer mit Mg ²⁺	10 µl	1,5 mM MgCl ₂
Enzym-Mix	1 µl	AMV und <i>Expand™ High Fidelity PCR System</i>
Total	25 ml	

*Die Verwendung von RNAse-Inhibitor ist optional, wird jedoch empfohlen, um den Einfluß kontaminierender RNAse so gering wie möglich zu halten.

2.3.5.3 Verwendete PCR-Primer

Die verwendeten PCR-Primer wurden von der Firma MWG-Biotech hergestellt. Die Primersequenzen sind im Anhang angegeben.

Das Reaktionsgemisch wird auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt und mit der jeweiligen Probe versetzt:

- 48µl PCR-Reaktionsgemisch
- 2 µl PCR-Probe
- bzw. 2 µl Positivkontrolle
- bzw. 2 µl steriles, deionisiertes Wasser als Negativkontrolle

Nach kurzem Mischen und Zentrifugieren der Ansätze wird die PCR nach folgendem Programm durchgeführt:

- 1 Zyklus 94°C, 2 min
- 55°C, 2 min
- 72°C, 2 min
- 34 Zyklen 94°C, 30 sek
- 55 °C, 1 min
- 72°C, 1 min
- 72°C, 4 min, dann auf 4° abkühlen lassen

Anschließend werden je 5 µl der PCR-Reaktionsansätze durch eine PAGE analysiert.

2.3.6 *In vitro*-Transkription

2.3.6.1 *In vitro*-Transkription

Die *In Vitro*-Transkription ermöglicht die direkte Umsetzung von DNA-Sequenzen in die entsprechende RNA, ohne auf biologische Systeme zurückgreifen zu müssen.

Durchführung

Zu 10–50 ng Plasmid-DNA werden 5 µl Reaktionsgemisch (siehe Tab. 2.5) und 5 U T7-RNA-Polymerase gegeben. Mit RNase-freiem Wasser wird der Ansatz auf 15 µl aufgefüllt und 30 min bei 37°C inkubiert.

Tab.2.5: Reaktionsgemisch für *in vitro*-Transkription

Substanz	Stammlösung	für 100 µl	Finale Konzentration
Tris/HCl	2 M, pH 7,5	7,5 µl	150 mM
MgCl ₂	100 mM	25µl	25 mM
DTT	100 mM	5µl	5 mM
dNTP's	100 mM	je 2µl	je 2 mM
RNase-freies H ₂ O		54,5 µl	

2.3.6.2 *In vitro*-Transkription/Translation

Das *TNT[®] T7 Quick Coupled Transcription/Translation System* wurde von der Firma Promega entwickelt. Es ermöglicht die Durchführung einer Transkription von DNA in RNA und der anschließenden Translation der RNA in das Protein in einem Schritt. Das Kit enthält:

1,6 ml	TNT [®] Quick Master Mix (8 x 200 µl)
5 µg	T7 Luziferase-Kontroll-DNA
50 µl	Methionin, 1 mM
250 µl	Luziferase- <i>Assay</i> Reagenz
1,25 ml	Nuklease-freies Wasser
100 µl	T7 TNT [®] PCR <i>Enhancer</i>

Das Kit sollte bei -70°C gelagert werden. Der Master Mix darf nicht öfter als zweimal aufgetaut und eingefroren werden. Daher sollte der Master Mix nach dem ersten Auftauen in 40 µl-Portionen aliquotiert und die nicht gebrauchten Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren, danach bis zur Anwendung wieder bei -70°C gelagert werden.

Es besteht die Möglichkeit, das Produkt durch Einbau von [³⁵S]Methionin in das Protein detektierbar zu machen. In Rahmen dieser Arbeit wurde statt dessen das nicht-radioaktive *TranscendTM Non-Radioactive Detection System* verwendet. Hierbei werden biotinylierte Lysinreste in das entstehende Protein eingebaut. Das biotinylierte Protein kann nach dem Western Blot durch Binden von Streptavidin-Alkalischer Phosphatase und eine anschließende Farbreaktion auf der Membran detektiert werden. Dem Transkription/Translations-Reaktions-

gemisch muß hierbei nicht-radioaktives Methionin sowie *Transcend*TM-Biotin-Lysyl-tRNA aus dem *Transcend*TM *Non-Radioactive Detection System*-Kit zugesetzt werden.

Als Positivkontrolle kann in einer parallel durchgeführten Reaktion die im Kit enthaltene T7 Luziferase Kontroll-DNA umgesetzt werden. Dabei entsteht aktive *full length*-Luziferase, die anschließend in einem Luziferase-*Assay* detektiert werden kann.

Durchführung

Mit Ausnahme der Inkubation sollten alle Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt werden. Nach Entnahme der Reagenzien aus dem Tiefkühlschrank wird der TNT[®] Quick Master Mix rasch in der Hand aufgetaut und dann auf Eis gestellt. Die übrigen Komponenten können bei RT aufgetaut und dann ebenfalls auf Eis gestellt werden. Das Reaktionsgemisch wird entsprechend Tabelle 2.6 angesetzt.

Tabelle 2.6: Reaktionsgemisch für eine TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translations-Reaktion

Komponenten	Reaktion	Positiv-Kontr.	Negativ-Kontr.
TNT [®] Quick Master Mix	40 µl	40 µl	40 µl
Methionin, 1 mM	1 µl	1 µl	1 µl
Template-Plasmid-DNA, 0,5 µg/µl	2 µl	-	-
<i>Transcend</i> TM Biotin-Lysyl-tRNA	1-2 µl	1-2 µl	1-2 µl
T7 Luziferase-Kontroll-DNA, 0,5 µg/µl	-	2 µl	-
RNase-freies H ₂ O	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 50 µl

Nach Zugabe aller Komponenten werden die Ansätze vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt und kurz anzentrifugiert. Dann werden sie für 60-90 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend können Aliquots der Produkte durch SDS-PAGE und Western Blot, die Positivkontrolle zusätzlich durch Luziferase-*Assay* untersucht werden. Die verbleibenden Produkte können bei -20°C gelagert werden.

Nachweis der Reaktionsprodukte

Für den kolorimetrischen Nachweis der Reaktionsprodukte auf der Western Blot-Membran wird das *TranscendTM Non-Radioactive Translation Detection System* der Firma Promega verwendet. Das Kit enthält:

30 µl	<i>TranscendTM</i> Biotin-Lysyl-tRNA
36 µl	Streptavidin-Alkalische Phosphatase
35 ml	<i>Western Blue[®]</i> Stabilisiertes Substrat für Alkalische Phosphatase

Im Handbuch wird empfohlen, für die SDS-PAGE 1-5 µl des Reaktionsgemisches mit 20 µl LAP zu denaturieren und hiervon 5 µl auf das SDS-Polyacrylamidgel aufzutragen. Nach Durchführung der SDS-PAGE und eines anschließenden Western Blots wird die Membran für 1 h bei RT in 15 ml TBS (siehe 2.3.12.3) + 0,5% Tween[®]20 geblockt. Der Puffer wird verworfen und die Membran in einer frisch angesetzten Lösung aus 4 µl Streptavidin-Alkalische Phosphatase in 15 ml TBS + 0,5% Tween[®]20 unter sanftem Schütteln für 45-60 min bei RT inkubiert. Danach wird die Membran 2 x 1 min in je 30 ml TBS + 0,5% Tween[®]20 und 2 x 1 min in je 30 ml TBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Färbung der Proteine durch Auftropfen von 1-5 ml *Western Blue[®]* Stabilisiertes Substrat für Alkalische Phosphatase auf die Membran und Inkubation bei RT unter sanftem Schütteln. Die Lösung sollte dabei vor starkem Licht geschützt werden. Reaktive Bereiche färben sich innerhalb von 1-15 min purpurrot. Wenn die Banden die gewünschte Intensität erreicht haben, wird die Membran für mehrere Minuten in deionisiertem Wasser gewaschen, das dabei mindestens einmal gewechselt werden sollte. Anschließend wird die Membran an der Luft getrocknet. Sie sollte lichtgeschützt gelagert werden.

Für den Luziferase-Assay werden in einem 5 ml-Sarstedt-Röhrchen 50 µl auf RT erwärmtes *Luciferase Assay Reagent* mit 2,5 µl des Luziferase-Kontroll-Ansatzes gemischt. Das Röhrchen wird sofort in den Lumaten gestellt und die Lumineszenz für 60 s gemessen.

2.3.7 Gel-Elektrophoresen

2.3.7.1 Agarosegel-Elektrophorese

Sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke läßt sich DNA der Größenordnung > 250 bp am besten mittels Agarosegel-Elektrophoresen auftrennen. Hierzu werden gewöhnlich 1 %ige Gele verwendet, die durch Aufkochen von 1 g Agarose in 100 ml 1 x TPE-Puffer hergestellt werden. Die Lösung wird nach einigen Minuten Abkühlen noch warm in eine horizontale Gelkammer gegossen, die vorher entsprechend der gewünschten Taschenzahl und -größe mit Plexiglaskämmen versehen wurde. Das abgekühlte und erstarrte Gel wird mit 1 x TPE-Puffer bedeckt. Vor dem Auftragen werden die Proben mit 3 x Agarose-Auftragspuffer versehen. Um bei der Auswertung die Größe der einzelnen linearen DNA-Fragmente abschätzen zu können, wird ein Standard mit DNA-Fragmenten definierter Größen mit aufgetragen. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente erfolgt die Elektrophorese über 1 bis 4 Stunden unter Wasserkühlung bei 60 bis 80 mA. Sie kann auch bei 10 bis 20 mA über Nacht laufen gelassen werden. Anschließend wird das Gel für 10 min in Ethidiumbromidlösung (20 µl auf 50 ml Wasser) gefärbt und für 20-30 min in Wasser entfärbt. Unter UV-Licht (312 nm) sind nun die DNA-Banden sichtbar und können mit einem Videosystem oder einer Kamera dokumentiert und unter präparativen Voraussetzungen mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden anfangs das Videosystem E.S.A.Y. der Firma Herolab, danach kurzzeitig eine Polaroid-Kamera und schließlich das Classic Uno System der Firma INTAS verwendet.

2.3.7.1.1 Puffer und Lösungen für Agarosegele

TPE-Puffer (10 x)

0,9 M Tris-Base

20 mM EDTA

pH 8,0 einstellen

Auftragspuffer für Agarosegele (6 x, MBI)

50 mM	EDTA
0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
0,25 % (w/v)	Xylencyanol FF
30 % (v/v)	Glycerin

2.3.7.1.2 Längenmarker für Agarosegele**Gene RulerTM 1 kb DNA-Leiter, MBI-Fermentas**

Der Marker enthält 14 definierte Fragmente mit einer Länge von 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.500, **3.000**, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 750, 500 und 250 Basenpaaren

Mass RulerTM DNA-Leiter, High Range, MBI-Fermentas

Dieser Marker dient dazu, sowohl die Größe von DNA-Fragmenten als auch ihre Konzentration zu bestimmen. Er enthält 9 definierte Fragmente mit einer Länge von 10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.500, 2.000 und 1.500 Basenpaaren. Nach der Elektrophorese von 20 µl dieses Markers enthalten die zugehörigen Banden 200, 160, 120, 100, 80, 60, 50, 40 und 32 ng DNA.

DNA/HindIII-Marker, MBI-Fermentas

Der Marker enthält 7 definierte Fragmente mit einer Länge von 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 2.027 und 564 Basenpaaren

2.3.7.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Kleine DNA-Fragmente, deren Größe zwischen 50 und 1.000 bp liegt, lassen sich am günstigsten über eine Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) auftrennen. Hierfür werden Minigele der Größe 9 x 7 x 0,1 cm benutzt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden meist 6 %ige, gelegentlich 10 %ige Polyacrylamidgele verwendet, deren Zusammensetzung in Tabelle 2.7 angegeben wird. Nach Anmischen der Gel-Lösung wird durch Zugabe von 25 µl N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin (TEMED) und 25 µl 40 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) die Polymerisation ausgelöst. Sofort danach wird die Lösung zwischen die Glasplatten der Gelkammer gegossen und der Kamm, durch den die Taschen gebildet werden, eingesetzt. Das Gel benötigt etwa 30 min, um vollständig zu polymerisieren. Danach kann es in die Elektrophoreseapparatur gespannt und die mit 3 x Azorubinpuffer versetzten Proben und der aus linearen DNA-Fragmenten definierter Größen bestehende Standard können aufgetragen werden. Als Laufpuffer dient 1 x TPE. Die Elektrophorese wird bei 30 mA durchgeführt und dauert etwa eine Stunde. Anschließend wird das Gel für 3 min in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und für 10 min in Wasser entfärbt. Danach sind die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar und können mit einem Videosystem dokumentiert werden (siehe 2.3.7.1).

Tabelle 2.7: Zusammensetzung von Polyacrylamidgelen verschiedener Konzentrationen

Komponente	6 %iges Gel	10 %iges Gel
30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	2 ml	3,33 ml
10 x TPE-Puffer	1 ml	1 ml
dd H ₂ O	7 ml	5,67 ml

2.3.7.2.1 Puffer und Lösungen für Polyacrylamidgele

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung

30 %ige Lösung von Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 37,5 zu 1

Azorubinauftragspuffer (AAP) für Acrylamidgele (3 x)

50 % (v/v) Glycerin
0,1 % (w/v) Azorubinfarbstoff
in 1x TPE-Puffer

2.3.7.2.1 Längenmarker für Polyacrylamidgele

Gene RulerTM 100 bp DNA-Leiter, MBI-Fermentas

Der Marker enthält 11 definierte Fragmente mit einer Länge von 1.000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 und 80 Basenpaaren.

Mass RulerTM DNA Leiter, Low Range, MBI-Fermentas

Dieser Marker dient zur Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten. Er enthält 11 definierte Fragmente mit einer Länge von **1.031**, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100, 80 Basenpaaren.

2.3.7.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Analog zu DNA-Fragmenten in der PAGE werden Proteine mittels SDS-PAGE (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Verfahren zur Überprüfung der Induktion bei Expressionsversuchen und zur Reinheitsbestimmung bei der Proteinaufreinigung eingesetzt. Ferner diente es zur Auftrennung eines Proteingemisches vor Durchführung eines Western Blots (siehe 2.3.12). Das SDS-PAGE-Gel besteht aus zwei Teilgelen, dem Trenngel und dem auf dem Trenngel aufpolymerisierten Sammelgel. Die Zusammensetzung der Teilgelen wird in Tabelle 2.8 angegeben. Es werden dieselben Gelkammern und Elektrophoreseapparaturen eingesetzt wie für die PAGE. Als Laufpuffer wird 1 x Laemmli-puffer verwendet. Vor dem Auftragen werden die Proben mit 2 x Laemmli-Auftragspuffer (LAP) versetzt und 5-10 min bei 95°C denaturiert. Als Standard wird ein Gemisch von Proteinen definierter Größe, vor Western Blots ein Rainbow-Marker verwendet, dessen definierte Banden zusätzlich farblich markiert sind. Die Elektrophorese wird bei 30 mA durchgeführt und dauert etwa 1 h. Anschließend wird das Gel entweder in Coomassie-Färbelösung aufgekocht und dann in

7 % Essigsäure entfärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen, oder für einen Western Blot weiterverwendet.

Tabelle 2.8: Zusammensetzung der beiden Teilgele für die SDS-PAGE

Komponente	Trenngel (15 %ig)	Sammelgel (6 %ig)
30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	5,8 ml	300 µl
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	2,8 ml	-
1 M Tris/HCl, pH 6,8	-	190 µl
1 % SDS	1 ml	150 µl
ddH ₂ O	0,4 ml	910 µl
Zum Start der Polymerisationsreaktion werden zugesetzt:		
TEMED	25 µl	5 µl
APS (40 %)	25 µl	5 µl

2.3.7.3.1 Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamidgele nach Laemmli

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung

30 %ige Lösung von Acrylamid und Bisacrylamid im Verhältnis 37,5 zu 1

Laemmlipuffer (10 x)

250 mM Tris/HCl, pH 8,3
1,9 M Glycin
1 % SDS

Laemmli-Auftragspuffer (2 x)

50 mM Tris/HCl, pH 6,8
100 mM DTT
2 % (w/v) SDS
0,1 % (w/v) Bromphenolblau
10 % (v/v) Glyzerin

Coomassie-Färbelösung

0,2 % (w/v)	<i>Coomassie Blue R 250</i>
0,05 % (w/v)	<i>Coomassie Blue G 250</i>
42,5 %	EtOH
5 %	MeOH
10 %	Essigsäure

Entfärbelösung

7 % (w/v) Essigsäure

2.3.7.3.2 Längenmarker für SDS-Polyacrylamidgele**Protein-Größenstandard (10 kDa Protein Ladder, Gibco BRL)**

Der Marker enthält zwölf definierte Fragmente der Größe 200, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, **50**, 40, 30, 20 und 10 kDa.

Protein Molecular Weight Marker, MBI-Fermentas

Der Marker enthält sieben Proteine der definierten Größen 116, 66,2, 45, 35, 25, 18,4 und 24,4 kDa.

Rainbow Marker RPN 756, Amersham Life Science

Der Marker enthält sieben individuell gefärbte Proteine der definierten Größen 220 (blau), 97,4 (orange), 66 (violett), 46 (gelb), 30 (orange), 21,5 (blau) und 14,3 (rot) kDa.

Rainbow Marker RPN 800, Amersham Life Science

Der Marker enthält zehn individuell gefärbte rekombinante Proteine der definierten Größen 250 (blau), 160 (rot), 105 (grün), 75 (gelb), 50 (violett), 35 (blau), 30 (orange), 25 (grün), 15 (blau) und 10 (rot) kDa.

2.3.8 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

2.3.8.1. Zellaufschluß und Bindung an GSH-Sepharose

Die Zellen einer 500 ml-Kultur werden in 20 ml mit 1% Triton X-100 und 0,2 mM PMSF (Stammlösung 0,1 M in Isopropanol, frisch angesetzt) versetztem PBS suspendiert und durch Ultraschallbehandlung im Eisbad (Branson Sonifier 250, Leistungsstufe 5, 50% *Output*, 3 x 20 Sekunden) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (6.000 g, 4°C, 30 min) werden die Zelltrümmer aus dem Lysat entfernt. Der Überstand wird danach sofort in ein 50 ml-Falcongefäß mit ca. 300 µl GSH-Sepharose überführt, die zuvor durch zweimaliges Waschen mit PBS equilibriert wurde, und unter Schwenken 30 min inkubiert. In diesem Schritt wird das im Zellysate befindliche GST-Fusionsprotein an die GSH-Sepharose gebunden. Anschließend wird die Sepharose durch 10-minütige Zentrifugation mit 1.000 g bei 4°C sedimentiert und einmal mit PBS + 1 M NaCl sowie zweimal mit PBS gewaschen. Zum Schutz gegen Proteolyse kann den Waschlösungen ebenfalls 0,2 mM PMSF zugesetzt werden. Nach dem Waschen wird die Sepharose in eine 6 ml-Säule mit Keramikfritte überführt. Hierbei wird das Falcongefäß mehrfach mit PBS in 1 ml-Portionen nachgespült, um an den Gefäßwänden haftende Sepharose abzulösen und dem übrigen Säulenmaterial hinzuzufügen, das auf diese Weise ein zusätzliches Mal gewaschen wird.

2.3.8.2 Elution

Für die anschließende Proteinisolierung stehen zwei Methoden zur Verfügung. Zum einen kann das GST-Fusionsprotein mit Hilfe von Thrombin gespalten werden. Das GST-Fragment bleibt in diesem Fall am Säulenmaterial gebunden, während sich das nicht mehr fusionierte Zielprotein im Eluat befindet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich die zweite Methode, das Eluieren des ungespaltenen GST-Fusionsproteins mit GSH-Puffer angewendet. Hierzu werden 500 µl (zum Erzielen höherer Proteinkonzentration im Eluat 300 ml) GSH-Puffer auf die Sepharose gegeben und für 10 min inkubiert. Bei diesem Elutionsschritt wird das Fusionsprotein von seiner GST-Bindungsstelle verdrängt und somit von der Sepharose abgelöst. Das Eluat wird in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß aufgefangen, ggf. mit Proteasehemmern versetzt und je nach Protein bei 4°C, -20°C oder -80°C aufbewahrt. Zuvor wird eine Probe zur Überprüfung des

Produktes auf dem Laemmligel entnommen. Der Elutionsschritt wird mehrere Male wiederholt, so daß mehrere Fraktionen Eluat aufgefangen werden.

Laut Handbuch für das GST Gene Fusion System der Firma Pharmacia (1993) können sämtliche Arbeitsschritte mit Ausnahme der Ultraschallbehandlung bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Es hat sich jedoch als zweckmäßig erwiesen, die Aufarbeitung empfindlicher Proteine möglichst weitgehend bei 4°C oder auf Eis durchzuführen.

2.3.8.3 Puffer für die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

PBS: Siehe 2.2.3

GSH-Puffer

10 mM Glutathion (reduziert)

50 mM Tris/HCl, pH 8,0

In 1-10 ml-Aliquots bei -20°C aufbewahren. Mehrfaches Wiederauftauen sollte vermieden werden.

2.3.9 Aufreinigung von (His)₆-Tag-Proteinen

2.3.9.1 Isolierung und Aufreinigung von (His)₆-Tag-Proteinen aus dem Zellysat

Das Zentrifugationspellet einer 500 ml-Kultur wird in 5 ml PDL mit 10 mM Imidazol aufgenommen. Die Zellen werden analog zur Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen (siehe 2.3.8) mit Ultraschall aufgeschlossen und die Zelltrümmer anschließend abzentrifugiert. Während der Zentrifugation wird eine Säule mit 1 ml Ni²⁺-NTA-Agarose befüllt und mit 15 ml PDL + 10 mM Imidazol äquilibriert. Dieser Schritt und die folgenden bis einschließlich der Elution erfolgen im Kühlraum bei 4°C.

Nach der Zentrifugation wird das klare Zellysat dreimal über die Säule gegeben, um das (His)₆-Tag-Protein an das Säulenmaterial zu binden. Es folgen zwei Waschschritte mit 10 ml PDL + 10 mM Imidazol und 3 ml PDL + 30 mM Imidazol, um unspezifisch gebundene Bestandteile zu entfernen. Die Waschfraktionen werden einzeln aufgefangen und aufbewahrt. Anschließend wird das Protein eluiert, indem in Einzelschritten je 2 ml PDL mit steigender Imidazolkonzentration von 50 mM über 75 mM, 100 mM, 150 mM bis 200 mM als Maxi-

malkonzentration auf die Säule gegeben werden. Die Fraktionen werden einzeln aufgefangen und gemeinsam mit den beiden Waschfraktionen und dem Säulenmaterial mittels einer SDS-PAGE analysiert (siehe 2.3.7.3). Das Probenvolumen darf wegen der Größe der Laemmligel-Auftragstaschen 20 ml nicht überschreiten. Daher kann es bei geringer Proteinkonzentration notwendig sein, die Proteine mittels einer TCA-Fällung aufzukonzentrieren.

2.3.9.2 TCA-Fällung

Zur Fällung der Proteine wird die Proteinlösung auf Eis mit 1/10 seines Volumens an 100 %iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis werden die ausgefällten Proteine für 15 min mit 14.000 UpM und bei 4°C in einer Eppendorf Zentrifuge 5415C abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 20 µl LAP aufgenommen. Sollte der Farbstoff des Puffers einen Farbumschlag zeigen, wird die Lösung mit 0,5 µl nicht eingestelltem 2 M Tris neutralisiert. Die Probe wird 5 – 10 min auf 95°C erhitzt und kann dann auf ein Laemmligel aufgetragen werden.

2.3.9.2 Puffer für die Aufreinigung von (His)₆-Tag-Proteinen

PDL-Puffer

30mM	KP _i , pH 7,2
100µM	DTT
0,01 % (v/v)	Lubrol

KP_i

Stammlösungen:

1 M KH₂PO₄

1 M K₂HPO₄

Stammlösungen so mischen, daß sich der gewünschte pH-Wert einstellt.

2.3.10 Gewinnung von Kern-Proteinen aus eukaryontischen Zellen

Nach dem Absaugen des Mediums von den Zellkulturschalen und dem Waschen der Zellen mit PBS werden die Zellen ohne Zugabe eines Extraktionspuffers, sondern nur durch Abspülen vom Schalenboden mit kaltem PBS mittels einer 1 ml-Pipette geerntet und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. In einer Eppendorf Zentrifuge 5415C werden sie bei 1.200 UpM und 4°C 5 min abzentrifugiert und das Zellpellet anschließend zweimal mit kaltem PBS gewaschen.

Eine zweite Möglichkeit besteht darin, die geernteten Zellen in ein 50 ml-Schraubdeckelgefäß zu überführen, das Volumen mit kaltem PBS auf 50 ml aufzufüllen und in der Heraeus Megafuge 1.0R bei 4°C 30 min mit 300 UpM zu zentrifugieren. Nach dem Abgießen des Überstandes wird das Zellpellet anschließend in einem Flüssigkeitsrest resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, noch einmal zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415C, 1.200 UpM, 5 min) und die überstehende Flüssigkeit abgesaugt.

Alle folgenden Schritte werden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Sofern dies nicht möglich ist, werden die Proben auf Eis gestellt.

Das erhaltene Zellpellet wird in 500 µl Puffer A resuspendiert, und für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellmembranen durch Ultraschall im Branson-Sonifier mit 1 x 3 Impulsen, Stufe 5, 50% *Output*, zerstört. Die Zelltrümmer werden nun 1 min bei 13.000 UpM abzentrifugiert, der Überstand enthält die cytosolischen Proteine. Das Pellet wird noch einmal mit 500 µl Puffer A gewaschen, abzentrifugiert und in 40 µl Puffer C + 4 µl 0.1% NP40-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 10–15 min wird 5-10 min bei 13.000 UpM abzentrifugiert. Die Zellkern-Proteine sind nun im Überstand enthalten und können bei –80°C tiefgefroren werden.

Tab.2.7: Puffer A, pH 7,9

Substanz	Stammlösung	für 50 ml	Endkonzentration
HEPES	500 mM, pH 7,9	1 ml	10,0 mM
KCl	500 mM	1 ml	10,0 mM
EDTA	500 mM, pH 8,0	10 µl	0,1 mM
EGTA	500 mM, pH 7,6	10 µl	0,1 mM
MgCl ₂	500 mM	2 ml	20,0 mM
*DTT	100 mM	10 µl/ml Lsg.	1,0 mM
*Leupeptin	5 mg/ml	2 µl/ml Lsg.	10 µg/ml

***Vor Versuchsbeginn frisch zugeben**

Tab.2.8: Puffer C, pH 7,9

Substanz	Stammlösung	für 50 ml	Endkonzentration
HEPES	500 mM, pH 7,9	2 ml	20 mM
NaCl	2500 mM	8 ml	400 mM
EDTA	500 mM, pH 8,0	0,1 ml	1 mM
EGTA	500 mM, pH 7,6	0,1 ml	1 mM
*DTT	100 mM	10 µl/ml Lsg.	1,0 mM
*PMSF	100 mM	10 µl/ml Lsg.	1,0 mM
*Leupeptin	5 mg/ml	2 µl/ml Lsg.	10 µg/ml

***Vor Versuchsbeginn frisch zugeben**

2.3.11 Immunopräzipitation mit CNBr-aktivierter Sepharose

2.3.11.1 Kopplung des Antikörpers an die Sepharose

Zunächst wird die gefriergetrocknete Sepharose in 1 mM HCl suspendiert, wobei 1 g des Sepharosepulvers ein Endvolumen von etwa 3,5 ml Gel ergibt. Nach dem Aufquellen wird die Sepharose in einer Säule für 15 min mit 200 ml HCl pro Gramm Sepharose gewaschen.

Der zu koppelnde Antikörper wird in Kopplungspuffer (KP; 0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) gelöst. Es wird empfohlen, 5 – 10 mg Protein/ ml Gel (bei kleineren Liganden 1 – 10 µmol/ ml Gel) einzusetzen und in 5 ml KP/ g gefriergetrocknetes Sepharosepulver zu lösen.

Die Kopplungslösung wird in der verschließbaren Säule zu der gewaschenen Sepharose gegeben und unter Rotieren für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Anschließend wird der überschüssige Ligand durch Waschen mit dem 5-fachen Gelvolumen an KP entfernt. Zum Blocken verbliebener aktiver Gruppen wird die Sepharose nun in 0,1 M Tris/HCl-Puffer bei pH 8,0 zwei Stunden bei RT inkubiert. Das Produkt wird nun dreimal abwechselnd mit 0,1 M Acetat-Puffer, pH 4,0 und 0,1 M Tris/HCl-Puffer + 0,5 M NaCl, pH 8,0 gewaschen, wobei von jedem Puffer mindestens das 5-fache Gelvolumen eingesetzt werden soll. Anschließend wird die Sepharose in letzterem Puffer bei 4°C aufbewahrt.

2.3.11.2 Immunopräzipitation

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Immunopräzipitationen ausschließlich mit den gemäß 2.3.10 gewonnenen Zellkernextrakten durchgeführt, daher beziehen sich alle im folgenden aufgeführten Mengenangaben auf diese eingesetzten etwa 40 – 50 µl Zellkernextrakt.

Durchführung

Zunächst werden 20 – 40 µl der mit Antikörper gekoppelten Sepharose in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 2 x mit je 200 µl Puffer TS1 gewaschen, dabei jeweils 5 min mit < 2000 UpM in einer Eppendorf Zentrifuge 5415C abzentrifugiert. Anschließend wird das in 500 µl Puffer TS1 gelöste Proteingemisch hinzugegeben und über Nacht bei 4°C unter Rotieren inkubiert.

Am nächsten Tag wird die Sepharose wie zuvor abzentrifugiert, der Überstand abpipettiert und für die Bestimmung der Effektivität der Immunopräzipitation aufbewahrt.

Die Sepharose wird wie folgt gewaschen:

- 2x mit je 400 µl Puffer TS2
- 1x mit 100 µl Puffer TS1
- 1x mit 100 µl Puffer TS3

Anschließend kann das aufgereinigte Protein durch Elution gewonnen werden oder, wie in dieser Arbeit ausschließlich durchgeführt, durch Erhitzen der Sepharose mit LAP für 10 min auf 95°C denaturiert und anschließend mittels eines Western Blots nachgewiesen werden.

2.3.11.3 Puffer und Lösungen für die Immunopräzipitation

Puffer TS1

0,01 M Tris·Cl
 0,14 M NaCl
 pH 8,0

Puffer TS2

0,01 M Tris·Cl
 0,14 M NaCl
 0,1 % Triton X-100
 pH 8,0

Puffer TS3

0,05 M Tris·Cl
 pH 6,8

2.3.12 Western Blot

2.3.12.1 Durchführung

In dieser Arbeit wurden nur *Semy Dry-Blots* mit dem unten aufgeführten Blotpuffer angewendet. Dazu wird das Acrylamidgel für einige Minuten in den Blotpuffer gelegt, bevor es in der Blotkammer auf drei ebenfalls in Blotpuffer eingeweichte Lagen Whatman-Papier, die als Ionenreservoir dienen, ausgebreitet wird. Die zunächst in Methanol, dann in Blotpuffer eingeweichte PVDF-Membran wird darüber gelegt und mit drei weiteren Lagen Blotpuffergetränktem Whatmanpapier bedeckt. Darüber kommt der Deckel der Blotkammer zu liegen.

Die Schichtung sollte luftblasenfrei erfolgen. Es wird mit maximal 12 V und 120 mA für 70 min geblottet. Anschließend kann das Gel mit Coomassie gefärbt werden, um die Effektivität des Blots zu überprüfen. Die Membran wird zum Blocken ihrer noch freien Bindungsplätze für 20 – 30 min bei RT in Blotto inkubiert, wie auch bei allen weiteren Inkubations- und Waschschritten unter sanftem Schütteln. Dann erfolgt die Inkubation mit dem spezifischen Antikörper, über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wird die Membran 3 – 4 x in TBS gewaschen und für zwei Stunden bei RT mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Da in dieser Arbeit als spezifische Antikörper nur solche, die aus der Maus gewonnen wurden, Anwendung fanden, wurde als zweiter Antikörper generell *HRP-goat-anti-mouse*-Antikörper eingesetzt, der mit Meerrettich-Peroxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP) konjugiert ist. Nach weiterem 3 – 4-maligen Waschen mit TBS erfolgt die Färbung mit Reagenzien, die von der HRP zu einem Farbstoff umgesetzt werden. Anfangs wurde hierfür eine Kombination aus Kobalt[II]chlorid, 4-Chlor-1-naphtol (je 1 Spatelspitze) sowie H₂O₂ (150 µl) in TBS eingesetzt, später das von der Firma Roche bezogene Reagenz *PM Blue POD Substrate*.

2.3.12.2 Eingesetzte Antikörper

- monoklonaler Anti-Myb-DNA-Bindungsdomäne-Antikörper 9E11, Maus IgG (Sleeman, 1993), zur Verfügung gestellt von K. H. Klempnauer (Institut für Biochemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster)
- monoklonaler Anti-HA, Clone HA-7, Maus IgG1 Isotyp, bezogen von der Firma Sigma
- *Goat anti Mouse IgG (H + L) Horseradish Peroxidase Conjugate, EIA Grade Affinity purified*, bezogen von der Firma Bio-Rad

2.3.12.3 Verwendete Puffer und Lösungen

<u>Blotpuffer</u>		<u>Puffer TBS</u>	
10 mM	Tris/HCl	10 mM	Tris/HCl
100 mM	Glycin	1 mM	EDTA
12,5%	Methanol	0,15 M	NaCl
		pH 8,0	

Blotto

5,0 %	Magermilchtrockenpulver
0,1 %	Entschäumer

2.3.13 Proteinbestimmung nach Bradford

Durch die Bindung von Coomassie Brilliant Blue G250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nach 595 nm, so daß sich der Proteingehalt einer Lösung durch Absorptionsmessungen bei 595 nm bestimmen läßt. Diese Methode ist für Proteinmengen von 1 bis 10 µg/ml geeignet. In Rahmen dieser Arbeit wurde sie zur Bestimmung des Gesamt-Proteingehalts von Zellkernextrakten angewandt. Die Proben der Zellkernextrakte wurden vor der Durchführung um den Faktor 1.000 verdünnt.

Mit Proteinlösungen eines definierten Gehalts von 0 bis 10 µg/ml wird zunächst eine Eichreihe erstellt. Als Standard sollte möglichst das zu messende Protein dienen. Da das bei Zellkernextrakten nicht möglich war, wurde BSA zur Eichung eingesetzt.

Es werden je 0,5 ml der Probe und des Bradford-Reagenzes gemischt und bei RT für 10 min inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 595 nm gemessen.

2.3.13.1 Bradford-Reagenz

0,06% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 in 0,6 N HCl

3. Durchführung und Ergebnisse

3.1 Isolierung und Klonierung des fog-1-Gens

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand darin, das fog-1-Gen, von dem der Arbeitsgruppe bisher nur das im *yeast two-hybrid-Assay* gefundene Fragment vorlag, in voller Länge zu isolieren. Das Gen sollte dann in einen eukaryontischen Vektor kloniert werden, um Transfektionsversuche durchführen zu können.

3.1.1 RT-PCR

Zunächst wurde versucht, das fog-1-Gen durch RT-PCR aus der Milz-RNA der Maus zu isolieren, da FOG-1 in der Milz sehr stark exprimiert wird. Als 5'-Primer wurde hierfür 5'-Fog, als 3'-Primer 3'-Fog (siehe Anhang) bzw. ein Oligo(dT)-Primer verwendet. 5'-Fog führt eine *BamHI*-, 3'-Fog eine *EcoRI*-Schrittstelle in das Produkt ein. 5'-Fog entspricht den ersten 21 Basen des fog-1-Gens, 3'-Fog ist komplementär zu 20 Basen am Ende des Gens einschließlich des Stop-Codons für die Translation.

Vor dem Ansetzen des RT-PCR-Reaktionsgemisches wurde die mRNA gemäß dem Oligotex mRNA *Spin-Column*-Protokoll (siehe 2.3.1) isoliert. Die RT-PCR wurde wie unter 2.3.5.2 beschrieben durchgeführt.

Es wurden mehrere RT-PCR mit unterschiedlichen *Annealing*-Temperaturen durchgeführt. Die Produkte wurden anschließend über eine PAGE (2.3.7.2) analysiert; dabei zeigte sich bei keiner Probe die erwartete Bande.

Zur Anwendung einer direkteren, eleganten Methode wurde beschlossen, den RT-Schritt durch Erwerb einer *Mouse Spleen* cDNA TriplExTM-Library von der Firma Clontech zu umgehen, und mit diesem *Template* direkt PCR-Versuche durchzuführen.

3.1.2 PCR

3.1.2.1 PCR an der *Mouse Spleen* cDNA TriplExTM-Library

Zunächst wurde die *Mouse Spleen* cDNA TriplExTM-Library wie unter 2.1.1.4 beschrieben titriert und amplifiziert. Die anschließende Titration des Lysates bestimmte eine Konzentration von 10^9 pfu/ml. Dies entspricht dem Titer einer erfolgreich amplifizierten Bibliothek. 10^6 Klone repräsentieren die gesamte mRNA eines eukaryontischen Genoms; dies entspräche 1 μ l des Lysats.

Mit der cDNA-Bibliothek als *Template* wurden diverse PCR-Versuche durchgeführt. Es wurden jeweils 1 μ l des Lysats eingesetzt. Als DNA-Polymerase wurde das *ExpandTM High Fidelity* PCR-System der Firma Boehringer Mannheim benutzt. Als Primer wurden wieder 5'-Fog und 3'-Fog verwendet. Da die Amplifikation einer ca. 3.000 bp großen DNA möglicherweise wegen der ungenügenden Prozessivität der DNA-Polymerase Schwierigkeiten bereitete, wurden ferner zwei neue Primer konzipiert, Fog5neu und Fog3neu. Fog5neu entspricht einer 21 Basen langen Sequenz im mittleren Bereich des fog-1-Gens (ab Base 1773 $\hat{=}$ AS 591), dem Anfang des im *yeast two-hybrid-Assay* gefundenen Fragments, und führt eine *BamHI*-Schnittstelle in das Produkt ein. Fog3neu ist komplementär zu einer 20 Basen-Sequenz am Ende des fog-1-Gens, die hinter dem Translations-Stop-Codon liegt, und trägt zusätzlich eine *EcoRI*-Sequenz. Mittels Fog5neu sollte versucht werden, einen größeren Abschnitt des Gens zu isolieren, als er bisher zur Verfügung stand. Fog3neu erhöhte die Anzahl der möglichen Primerpaarungen und somit die Chance auf einen Erfolg.

Es wurden diverse PCR-Reaktionen durchgeführt, wobei neben den Primerpaarungen auch die folgenden Parameter variiert wurden:

- Die *Annealing*-Temperatur; wobei diese während der ersten Zyklen zwischen 45°C und 47°C betrug (da die Primer wegen der einzuführenden Restriktionsschnittstellen nicht in voller Länge mit der Template-DNA hybridisieren konnten), in allen weiteren Zyklen dann zwischen 50°C und 60°C. Zwischen *Annealing* und *Elongation* wurde eine Temperatur-Rampe von 1 °C/s eingesetzt.
- Die *Elongations*-Temperatur; neben der normalen Temperatur von 72°C wurde in einigen Versuchen 68 °C gewählt, da diese Temperatur in der Vorschrift für das *ExpandTM High Fidelity* PCR-System für Produkte von 3 - 10 kb empfohlen wird.

- Die $MgCl_2$ -Konzentration
- Die Dauer der *Annealing*- und der *Elongations*-Phase
- Es wurde dem Ansatz *Q-Solution* (Qiagen) zugesetzt, die das Schmelzverhalten der DNA beeinflusst.
- Es wurden *Hot-Starts* durchgeführt (die Polymerase wurde erst nach der ersten, 5-minütigen Denaturierungsphase zu dem Reaktionsgemisch gegeben)
- Es wurden *Nested-PCR* durchgeführt, mit 5'-Fog und Fog3neu als erstem Primerpaar, Fog5neu und 3'-Fog als zweitem Primerpaar.

Keiner der Versuche führte zu dem gewünschten Ergebnis. Anfangs wurden keine, später mehrere Banden erhalten. An einigen Produkten wurden analytische Restriktionsspaltungen durchgeführt, die nicht zu dem erwarteten Ergebnis führten.

Die Versuche mit der cDNA-Bibliothek wurden aufgegeben, als von Stuart H. Orkin (Children's Hospital, Harvard University, Boston, USA) das *full length-fog-1*-Gen zur Verfügung gestellt wurde.

3.1.2.2 PCR an *full length-fog-1*-Plasmiden

Es wurden fünf verschiedene Plasmide von Stuart Orkin zur Verfügung gestellt, die das *fog-1*-Gen enthalten sollten. Es handelte sich dabei um ein pUC18-Plasmid, in das die *fog-1*-Sequenz via *HindIII* und *EcoRI* kloniert worden war, ein pFastBac-Plasmid mit *His-fog-1* über *NotI* und *XbaI* kloniert, ein Plasmid namens pEfrHAPGKpuropA, das eine HA-*fog-1*-Sequenz an seiner *BamHI*-Site tragen sollte, ein pBluescript-Plasmid (pBS), zu dem die Klonierungsstrategie nicht bekannt ist, sowie ein Plasmid mit dem Namen pMT2, in das *fog-1* via *EcoRI* eingefügt worden war.

Von diesen wurde das pMT2-*fog-1*-Plasmid als Template für weitere PCR-Versuche unter Verwendung von *Taq*-Polymerase eingesetzt.

Ferner wurde die *fog-1*-Sequenz mit *EcoRI* aus dem Plasmid geschnitten und als Template für PCR-Versuche verwendet. Es wurden wiederum verschiedene PCR mit variablen Bedingungen durchgeführt, doch gelang es nicht, das gewünschte Fragment zu isolieren.

3.1.3 Klonierung des fog-1-Gens in den pcDNA-Vektor

Es wurden verschiedene Klonierungsstrategien angewandt, um das fog-1-Gen aus einem der fünf Vektoren zu schneiden und in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA1.1/Amp einzufügen. Dies erwies sich als äußerst schwierig, da einige der Plasmidkarten fehlerhaft oder unvollständig waren. Eine analytische Restriktionsspaltung an pUC18fog sowie eine analytische PCR ergaben, daß das in diesem Plasmid enthaltene fog-1-Gen offenbar nicht fehlerfrei war.

Das fog-1-Gen wurde schließlich mittels *Bam*HI und *Xho*I aus pFastBac geschnitten, direkt in den pcDNA1.1/Amp-Vektor ligiert und anschließend sequenziert. Das erhaltene pcDNAFOG-Plasmid wurde für Transfektionsversuche verwendet und diente als Ausgangsmaterial für weitere Klonierungen.

3.2 Reporter-Gen-Assays

Mit dem pcDNAFOG-Plasmid wurden verschiedene transiente Transfektionen für Luziferase-Assays durchgeführt, wobei jeweils das Plasmid pEQ176 (β -Galaktosidase) kotransfiziert wurde, um über einen β -Galaktosidase-Assay eine Normierung zu ermöglichen (siehe 2.2.6). Sofern nicht anders angegeben, wurden sämtliche Transfektionen an HEK 293-Zellen durchgeführt.

3.2.1 Untersuchung des Einflusses von FOG-1 auf c-Myb

3.2.1.1 Transfektion von c-Myb, FOG-1 und C/EBP α

Zunächst wurden Transfektionen mit den Plasmiden pcDNAMyb, pcDNAFOG und pCMV-CEBP α durchgeführt, um festzustellen, ob sich ein Einfluß von FOG-1 auf c-Myb und C/EBP α bemerkbar macht. Als Reporterplasmid wurde pMim-1Luc eingesetzt.

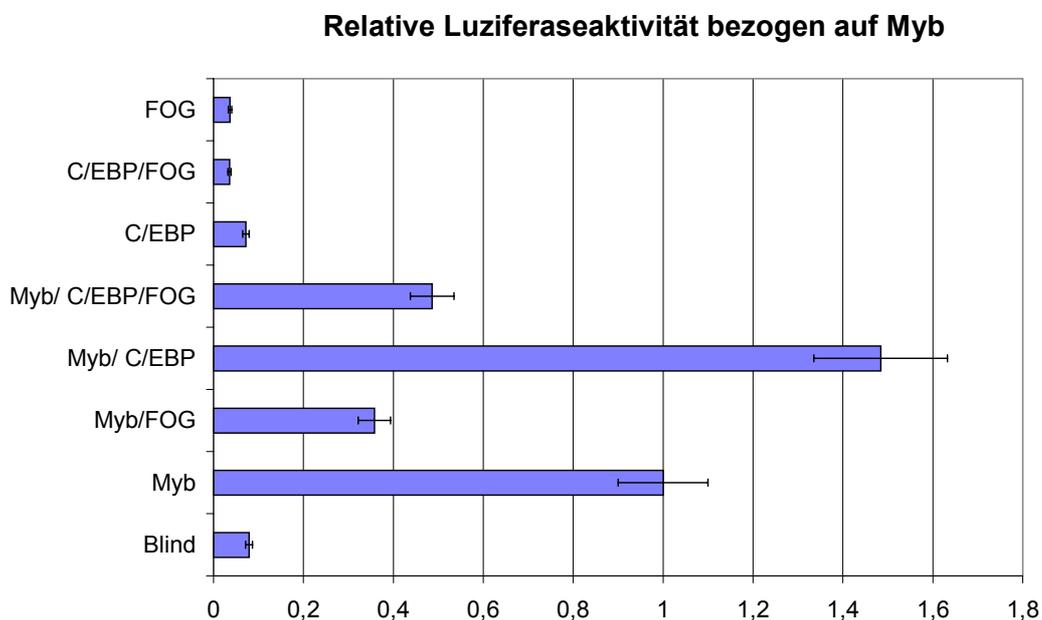


Abb. 3.1: Einfluß von FOG-1 auf die Aktivität von c-Myb und C/EBP α im Luziferase-Assay

Wie in Abbildung 3.1 zu sehen, hat FOG-1 eine negativ regulatorische Wirkung auf c-Myb. Der Komplex aus c-Myb und C/EBP α zeigt wie zu erwarten eine größere Aktivität als c-Myb allein, wird durch FOG-1 jedoch ebenfalls deutlich inhibiert. Zur Kontrolle wurden C/EBP α und FOG-1 jeweils allein und gemeinsam (mit dem Reporter- und dem Normierungsvektor) transfiziert; bei diesen Transfektionen liegen die im Luziferase-Assay erhaltenen Signale im vernachlässigbaren Bereich.

3.2.1.2 Dosisabhängige Regulation der c-Myb Aktivität durch FOG-1

Auf diesem Ergebnis aufbauend wurden Versuchsreihen durchgeführt, in denen pcDNAFOG in unterschiedlichem Mengenverhältnis zu pcDNAMyb transfiziert wurden. Das Verhältnis von pMim-1Luc und pEQ176 zu pcDNAMyb war immer stöchiometrisch. Das reproduzierbare Ergebnis zeigt, daß die Inhibierung der Aktivität von c-Myb durch FOG-1 dosisabhängig erfolgt (siehe Abbildung 3.2).

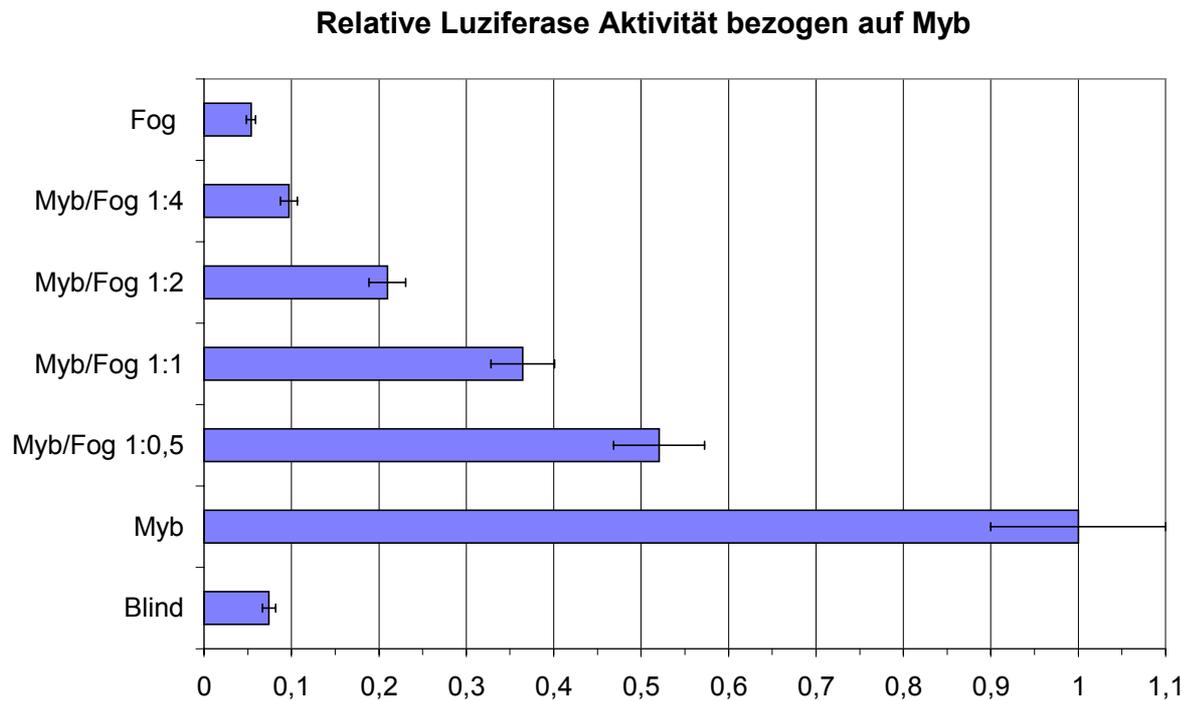


Abb. 3.2: Dosisabhängige Inhibierung der c-Myb-Aktivität durch FOG-1 im Luziferase-Assay

Gleiche Versuchsreihen wurden auch für C/EBP α und FOG-1 durchgeführt. Sie erbrachten ein ähnliches Ergebnis wie die Versuche mit c-Myb (siehe Abbildung 3.3), wobei allerdings die normierten Luziferase-Assay-Werte der c-Myb-Transfektionsversuche um den Faktor 4 höher liegen als die der C/EBP α -Versuche.

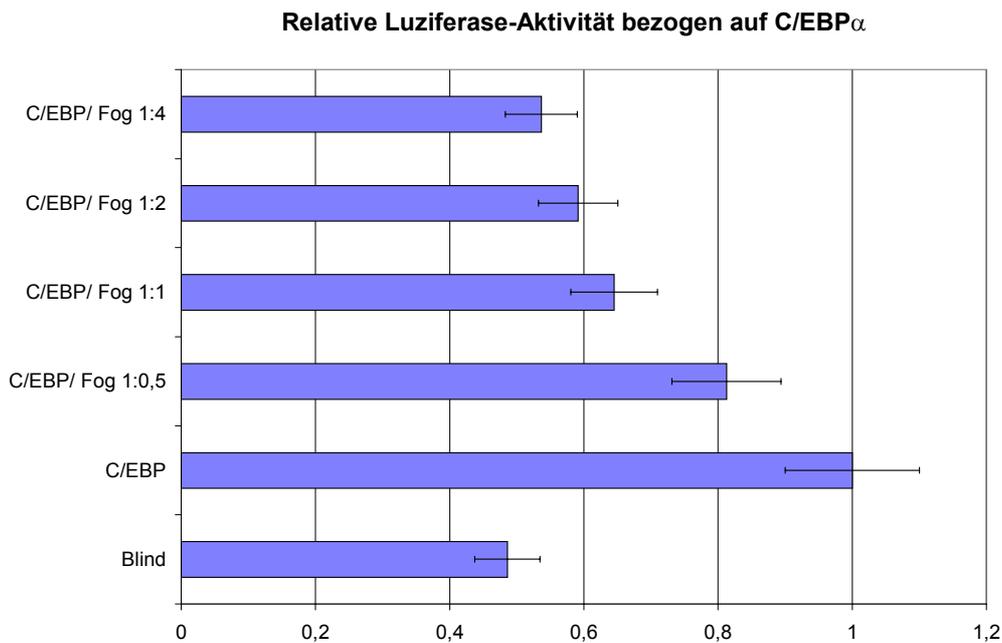


Abb. 3.3: Dosisabhängige Inhibierung der C/EBP α -Aktivität durch FOG-1 im Luziferase-Assay

3.2.1.3 Einfluß von FOG-1 auf eine c-Myb-Deletionsmutante

Die Tatsache, daß im *yeast two-hybrid-Assay* eine Interaktion von FOG-1 mit dem C-Terminus von c-Myb festgestellt worden war (siehe 1.3.2.5), ließ vermuten, daß durch eine Deletion des C-Terminus der negativ regulierende Einfluß von FOG-1 auf die Transaktivierungsaktivität von c-Myb vermindert oder aufgehoben werden könnte. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde eine entsprechende c-Myb-Deletionsmutante ausgehend vom Plasmid pcDNAMyb hergestellt. Das Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen *SmaI* und *Eco47III* geschnitten, wodurch der 5'-Terminus des c-myb-Gens ab Basenpaar 974 entfernt wurde. Die entstandenen *blunt ends* wurden religiert. Das Genprodukt der so erhaltenen c-myb-Deletionsmutante besteht aus den Aminosäuren 1 - 324 des normalen Proteins; die gesamte Negativ Regulatorische Domäne ist deletiert.

Es wurden Transfektionsreihen durchgeführt, in denen der Einfluß von FOG-1 auf diese c-Myb-Deletionsmutante (Myb-Del) und auf das normale c-Myb, allein und in Gegenwart von C/EBP α , miteinander verglichen wurden (siehe Abbildung 3.4).

Wie erwartet zeigt sich, daß die Deletion der Negativ Regulatorischen Domäne die Transaktivierungsaktivität von c-Myb erhöht. C/EBP α hat auch auf die c-Myb-Deletionsmutante einen aktivierenden Einfluß, obwohl bei der Deletion auch ein Teil der CBP-Bindungsdomäne ent-

fernt wurde. Allerdings wirkt FOG-1 trotz der Deletion des C-Terminus und damit der bekannten FOG-1-Wechselwirkungsdomäne von c-Myb weiterhin inhibierend. Dies könnte bedeuten, daß FOG-1 auch mit anderen Domänen von c-Myb interagiert, oder aber daß die Inhibition indirekt über einen weiteren Kofaktor erfolgt.

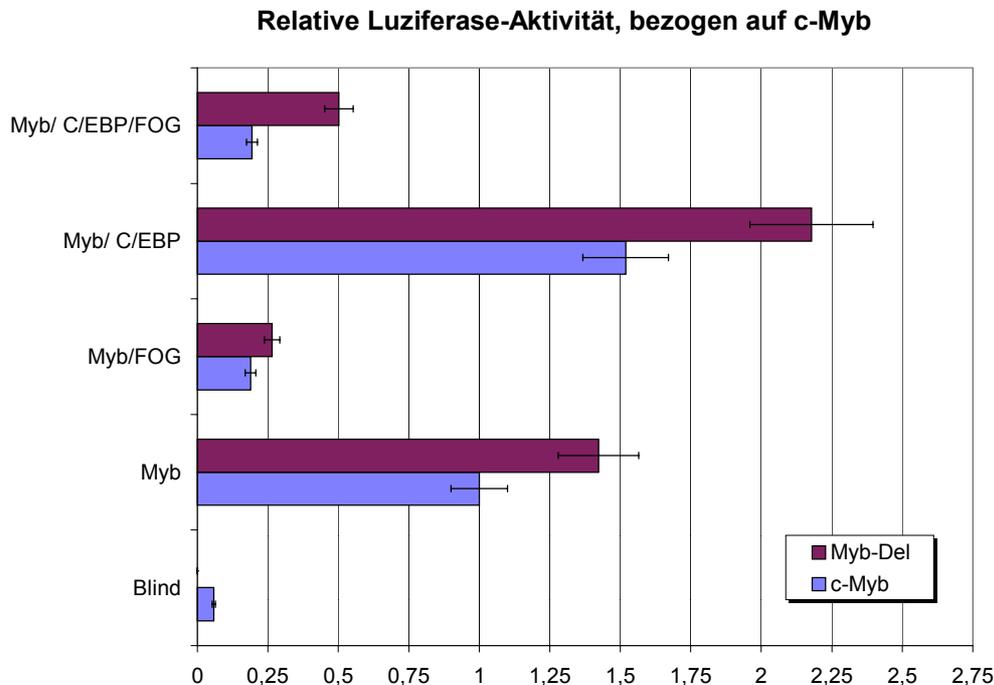


Abb. 3.4: Einfluß von FOG-1 auf die Aktivität einer C-terminal deletierten Mutante von c-Myb im Luziferase-Assay, allein und in Gegenwart von C/EBP α
Myb-Del: c-Myb-Deletionsmutante, AS 1-324

3.2.1.4 Transfektionen mit weiteren c-Myb-Deletionsmutanten

Zwei weitere, in eukaryontischen Vektoren befindliche, c-myb-Deletionsmutanten und ein dazugehöriges Reporterengenkonstrukt wurden freundlicherweise von Bernhard Lüscher (Institut für Molekularbiologie, MHH) zur Verfügung gestellt. Die beiden Mutanten kodieren für die Aminosäuren 201-358 (GM5) bzw. 201-325 (GM12) des c-Myb-Proteins, es wurden also auch die DNA-Bindungsdomänen deletiert. Statt dessen wurde die DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 der Hefe eingefügt (Kalkbrenner *et al.*, 1990). In dem dazugehörigen Reporterengenkonstrukt wird das Luziferasegen von einem Promotor kontrolliert, der die Gal4-Bindungssequenz enthält, so daß es durch die Gal4-Fusionsproteine aktiviert werden

kann. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten jedoch mit diesen Konstrukten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden (Daten werden nicht gezeigt).

3.2.1.5 Transfektionen mit FOG-1-Deletionsmutanten

3.2.1.5.1 Deletion des 6. Zinkfingers

Im *yeast two-hybrid Assay* wurde der 6. Zinkfinger von FOG-1 als die mit dem C-Terminus von c-Myb interagierende Domäne identifiziert (siehe 1.3.2.5). Nachdem festgestellt worden war, daß die Deletion des C-Terminus von c-Myb die inhibitorische Wirkung von FOG-1 nicht verringerte, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob das FOG-1-Protein ohne Zinkfinger 6 seine negativ regulatorische Wirkung auf c-Myb weiterhin ausüben kann.

Zu diesem Zweck wurde eine entsprechende Deletionsmutante des *fog-1*-Gens hergestellt. Als Ausgangsmaterial wurde hierfür der Vektor pHAFOG verwendet, der durch Einfügen eines *HA-Tags* aus dem pcDNAFOG-Plasmid entstanden war (siehe 3.6.1), um das exprimierte Fusionsprotein ggf. mittels eines Anti-HA-Antikörpers identifizieren und isolieren zu können. Eine Untersuchung der pHAFOG-Sequenz ergab, daß sich zwei *SacII*-Schnittstellen kurz vor und hinter der Zinkfinger 6-Sequenz befinden, die im selben Leseraster liegen, so daß sie sich zum Deletieren des sechsten Zinkfingers eignen. Das Plasmid wurde entsprechend mit *SacII* verdaut, über eine Agarosegel-Elektrophorese aufgereinigt und anschließend religiert. Die deletierte Sequenz kodiert die Aminosäuren 672-740 des FOG-1-Proteins.

Mit diesem Plasmid wurden Transfektionsreihen durchgeführt, um die Wirkung von FOG-1 und der Deletionsmutante FOGZnFi6del sowohl auf c-Myb als auch auf Myb-Del zu vergleichen (siehe Abbildung 3.5).

Wie aus den Daten zu ersehen ist, hat FOG-1 nach der Deletion des Zinkfinger 6 die gleiche inhibitorische Wirkung sowohl auf c-Myb als auch auf die C-terminal verkürzte c-Myb-Mutante wie das normale FOG-1-Protein. Dies war insofern zu erwarten, als FOG-1 die Aktivität von Myb-Del ebenso negativ regulieren konnte wie die Aktivität von c-Myb. Die Interaktion zwischen dem C-Terminus von c-Myb und dem sechsten Zinkfinger von FOG-1 ist offenbar für die Inhibierung der Transaktivierung nicht essentiell.

Der Versuch wurde in COS-7-Zellen mit einem ähnlichen Ergebnis durchgeführt (Daten nicht abgebildet).

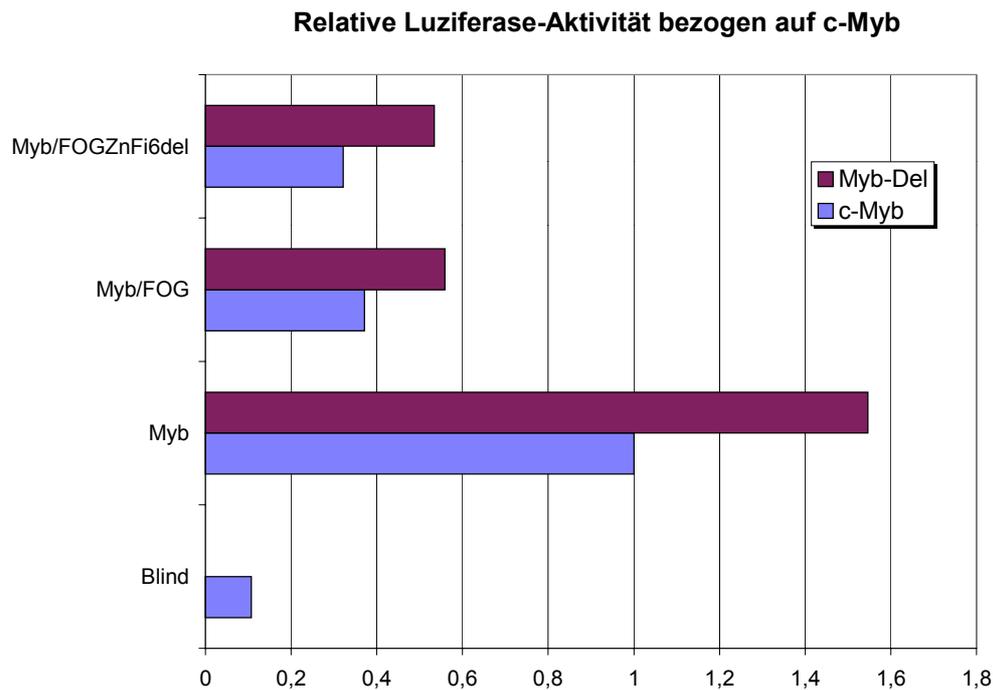


Abb. 3.5: Einfluß von FOG-1 und FOGZnFi6del auf c-Myb und Myb-Del im Luziferase-Assay
Myb-Del: c-Myb-Deletionsmutante, AS 1-324
FOGZnFi6del: FOG-1-Deletionsmutante, in der die AS 672-740 (enthalten den 6. Zinkfinger) deletiert wurden

Ferner wurden Kotransfektionen von FOG-1 und FOGZnFi6del mit den Myb-Mutanten GM5 und GM12 sowie dem dazugehörigen Reporterplasmid (3.2.1.4) durchgeführt, die im Luziferase-Assay erhaltenen normierten Meßwerte lagen jedoch auf dem Niveau des Blindwertes oder darunter und waren somit nicht aussagekräftig (Daten nicht abgebildet).

3.2.1.5.2 Deletion der Zinkfinger 1-4

Zur Erstellung einer weiteren Deletionsmutante wurden die beiden *BglIII*-Schnittstellen des pHAFOG-Plasmids benutzt, von denen die erste vor dem Zinkfinger 1, die zweite direkt hinter dem Zinkfinger 4 liegt, und die sich beide im selben Leseraster befinden. Durch den Verdau mit *BglIII* wurde eine 648 Basenpaare lange Sequenz aus dem fog-1-Gen deletiert, die die Aminosäuren 178-394 des FOG-1-Proteins kodiert. Das Plasmid wurde nach Aufreinigung über eine Agarosegel-Elektrophorese religiert und als pFOGZnFi(1-4)del in Transfektionsversuchen eingesetzt, in denen die inhibitorische Wirkung der FOG-1-Mutante FOGZnFi(1-4)del auf c-Myb und Myb-Del mit der Wirkung von FOG-1 verglichen wurde (siehe Abbildung 3.6).

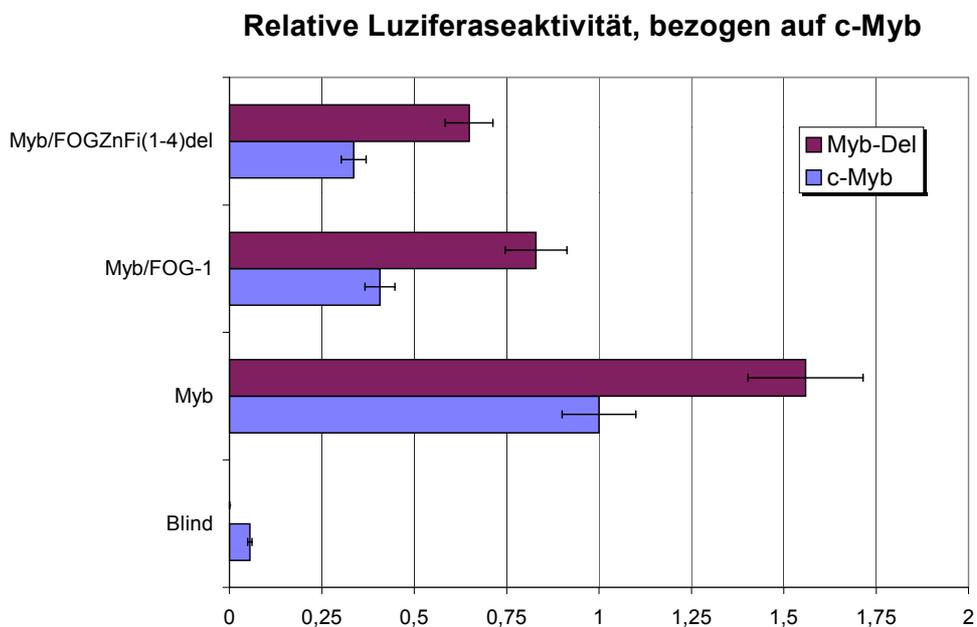


Abb. 3.6: Vergleich des Regulativen Einflusses von FOG-1 und FOGZnFi(1-4)del auf die Aktivität von c-Myb und Myb-Del im Luziferase-Assay

Myb-Del: c-Myb-Deletionsmutante, AS 1-324

FOGZnFi(1-4)del: FOG-1-Mutante, in der die AS 178-394 (enthalten die Zinkfinger 1-4) deletiert wurden

Wie die Meßergebnisse zeigen, hat auch die FOG-1-Mutante, in der die ersten vier Zinkfinger deletiert wurden, eine ebenso starke inhibitorische Wirkung auf die Transaktivierungsaktivität von c-Myb und Myb-Del wie das normale FOG-1-Protein. Die ersten vier Zinkfinger des FOG-1-Proteins sind also offenbar für die negative Regulation sowohl von c-Myb als auch von der C-terminal verkürzten c-Myb-Mutante nicht essentiell.

3.2.1.5.3 Deletion der Zinkfinger 1-4 und 6

Um festzustellen, ob Zinkfinger 6 und einer oder mehrere der ersten vier Zinkfinger von FOG-1 den Verlust der jeweils anderen Domäne möglicherweise kompensieren können, wurde daraufhin eine Deletionsmutante erstellt, in der beide Domänen fehlen. Hierfür wurde das Plasmid pFOGZnFi(1-4)del mit *SacII* geschnitten, um auch den Zinkfinger 6 zu deletieren, und nach Aufreinigung über ein Agarosegel religiert. Das so entstandene Plasmid pFOGZnFi(1-4,6)del wurde wiederum für Transfektionsversuche mit c-Myb und Myb-Del, zum Vergleich von FOGZnFi(1-4,6)del mit FOG-1, eingesetzt (siehe Abbildung 3.7).

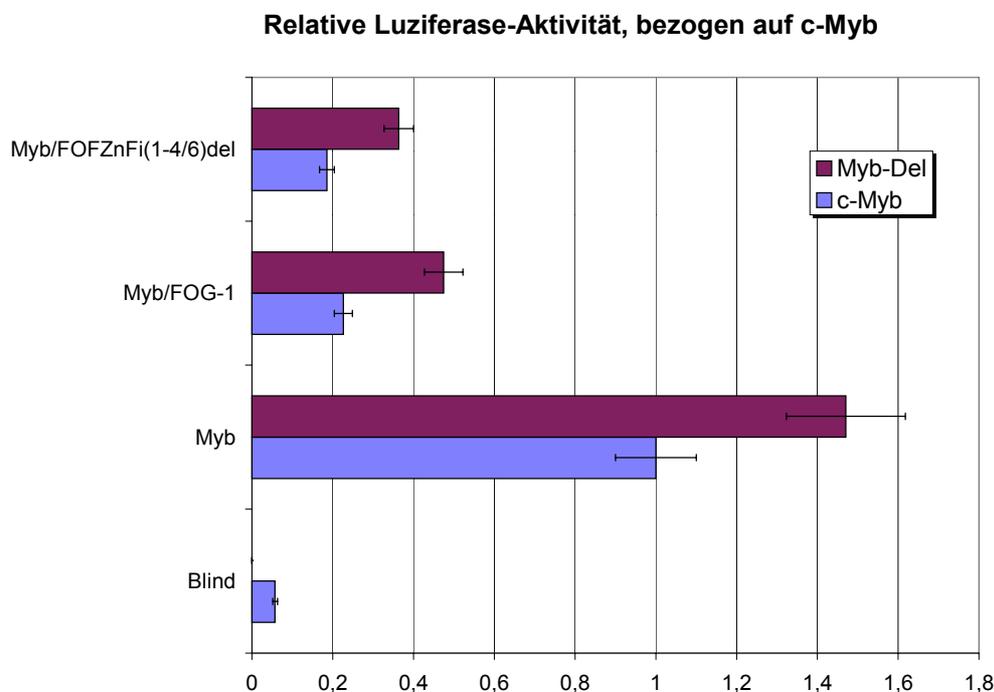


Abb. 3.7: Vergleich des Einflusses von FOG-1 und FOGZnFi(1-4,6)del auf die Aktivität von c-Myb und Myb-Del im Luziferase-Assay

Myb-Del: c Myb-Deletionsmutante, AS1-324

FOGZnFi(1-4,6)del: FOG-1-Mutante, in der die AS 178-394 sowie 672-740 (enthalten die Zinkfinger 1-4 bzw. Zinkfinger 6) deletiert wurden

Die gewonnenen Daten belegen, daß auch die FOG-1-Mutante, der sowohl die ersten vier als auch der sechste Zinkfinger fehlen, einen ebenso starken inhibitorischen Einfluß auf die Transaktivierungsaktivität von c-Myb wie auch von Myb-Del besitzt wie das normale FOG-1-Protein. Alle fünf Zinkfinger sind für die negativ regulierende Interaktion von FOG-1 mit c-Myb nicht essentiell, die verbliebenen Zinkfinger 5, 7, 8 und 9 dafür ausreichend.

Es waren weitere Untersuchungen in diese Richtung geplant – der nächste Schritt sollte die Deletion des neunten Zinkfingers mit anschließenden Transfektionen sein – sie konnten jedoch aufgrund gravierender Probleme in der Zellkultur, die unter 3.3 erläutert werden, nicht mehr durchgeführt werden.

3.2.2 Transfektionen mit pcDNAGATA-1

Da die Interaktion zwischen GATA-1 und FOG-1 für die Differenzierung hämatopoetischer Zellen essentiell ist, sollte GATA-1 in die Untersuchung der c-Myb/FOG-1-Wechselwirkungen einbezogen werden. Um bei Transfektionen eingesetzt werden zu können, wurde das gata-1-Gen, das uns freundlicherweise von Martin Zenke (Max-Delbrück Center für Molekulare Medizin, Berlin-Buch) zur Verfügung gestellt worden ist, in den pcDNA-Vektor umkloniert. Da der mim-1-Promotor auch eine GATA-Sequenz besitzt, wurde in ersten Transfektionsreihen mit pcDNAGATA-1, pcDNAMyb und pcDNAFOG-1 der Vektor pMim-1Luc als Reporterplasmid eingesetzt. In diesen Versuchen zeigte GATA-1 keinerlei Transaktivierungsaktivität.

Aus diesem Grund stellte Petr Bartunek (Max-Delbrück Center für Molekulare Medizin, Berlin-Buch) zwei Reporterkonstrukte mit Myb- und GATA-1-Bindungssequenzen zur Verfügung. Mit diesen Plasmiden wurden mehrere Transfektionsreihen in HEK 293- und in COS-7-Zellen durchgeführt. Es wurden keine verwertbaren Ergebnisse erhalten. GATA-1 zeigte mit keinem der Reporterplasmide eine erkennbare Aktivierung des Luziferasegens, die Kotransfektion von pcDNAGATA-1 mit pcDNAMyb und pcDNAFOG-1 erbrachte keine Änderung des Verhaltens von c-Myb und FOG-1 (Daten werden nicht gezeigt).

3.2.3 Transfektionen mit dem *Mercury Pathway Profiling Luciferase System*

Es wurden Transfektionen mit pcDNAFOG-1 und dem *Mercury Pathway Profiling Luciferase System* (siehe 2.2.7) durchgeführt, um den Einfluß von FOG-1 auf verschiedene Signaltransduktionswege zu untersuchen. Hierfür wurden HEK 293-Zellen benutzt. Bei und nach der Transfektion wurde serumfreies Medium verwendet, um störende Einflüsse durch das

Serum zu vermeiden. Wie Abbildung 3.8 zeigt, hat FOG-1 auf den AP1-Signaltransduktionswege einen erkennbaren, jedoch eher geringen inhibierenden Effekt. Die anderen Signaltransduktionswege lassen keinen signifikanten Einfluß von FOG-1 erkennen. Der Leervektor pTAL-Luc diente als Negativkontrolle, die durch ihn gewonnenen Werte als Blindwert.

relative Luziferase-Aktivität, bezogen auf den Blindwert

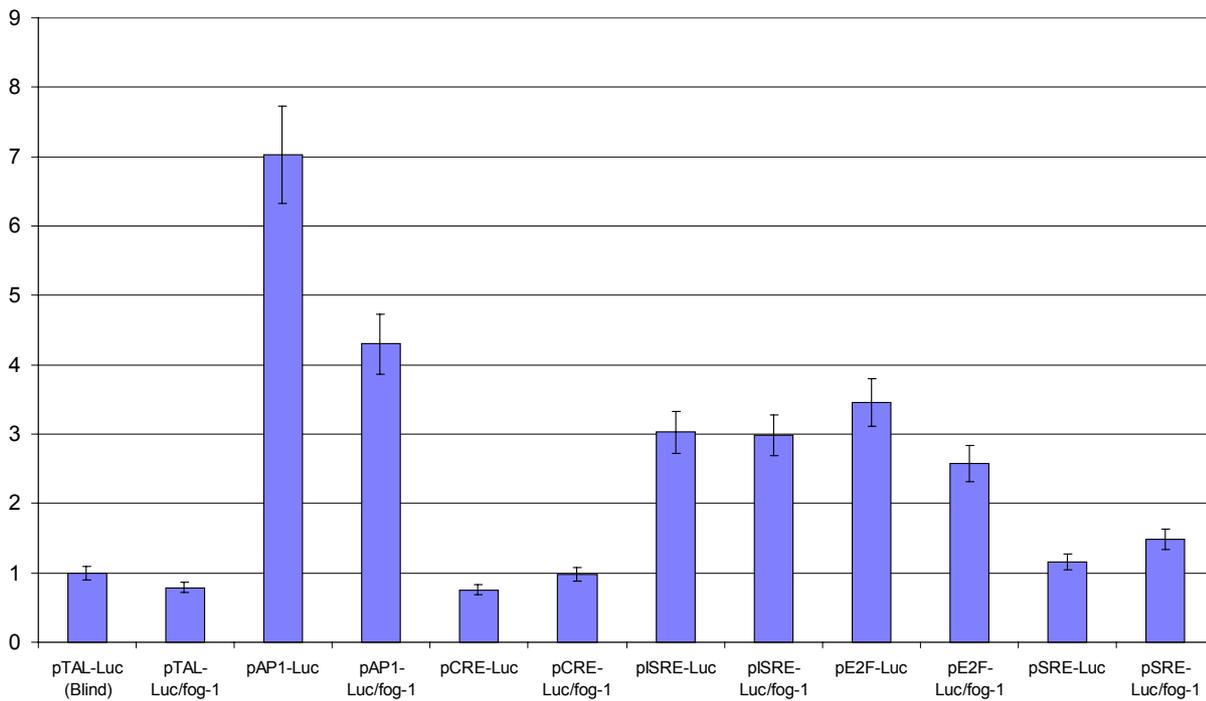


Abb. 3.8: Transfektionsreihen mit den Vektoren des *MercuryPathway Profiling Systems* und pcDNA-FOG-1

3.3 Probleme mit der Zellkultur

Im Verlauf meiner praktischen Arbeiten wurde die von meiner Arbeitsgruppe für die Zellkultur benutzte sterile Werkbank als defekt ausgemustert und durch ein anderes, gebrauchtes Modell ersetzt. Bevor die neue Werkbank in Betrieb genommen wurde, wurden an ihr durch Fachleute ein Filteraustausch sowie eine Begasung zur Desinfektion vorgenommen. Kurze Zeit später bemerkten wir an unseren Zellen ein verändertes Wachstumsverhalten und eine höhere Sterberate als zuvor. Unter dem Mikroskop waren fremde Organismen erkennbar, die sich sowohl frei beweglich im Medium befanden als auch an den Zellen hafteten. Wir schickten eine Probe an das Institut für Mikrobiologie, dessen Befund auf Mycoplasmen lautete, aber nichts über die unter dem Mikroskop erkennbaren Organismen besagte, bei denen es sich nicht um Mycoplasmen handeln konnte. Eine Behandlung der Zellen mit dem Präparat Ciprobay[®] der Firma Bayer (Wirkstoff: Ciprofloxacin) drängte die Infektion mit den unbekanntem Organismen zurück. Ciprofloxacin ist auch als wirksam gegen Mycoplasmen beschrieben worden (Schmitt *et al.*, 1988). Es wurden 2,5 ml einer 200 mg/100 ml Infusionslösung auf 500 ml Medium eingesetzt (Endkonzentration: 10 µg/ml). Das Wachstumsverhalten der Zellen normalisierte sich vorübergehend, doch bei Absetzen des Wirkstoffes trat die Infektion nach kurzer Zeit wieder auf. Eine längerfristige Behandlung mit Ciprobay wurde von den Zellen jedoch nicht gut vertragen, was sich ebenfalls in verändertem Wachstumsverhalten, verringerter Wachstumsgeschwindigkeit und erhöhter Sterberate äußerte. Daraufhin wurden sämtliche Zellkulturen eingestellt, die sterile Werkbank und der Brutschrank gründlich gereinigt. Von Michael Martin (Institut für Pharmakologie, MHH) wurden uns neue HEK 293- und COS-7-Zellen zu Verfügung gestellt. Es wurde frisches Medium und PBS zu Kultivierung benutzt. Die Zellen sahen zunächst gesund aus und zeigten normales Verhalten, doch nach kurzer Zeit trat die unbekannte Infektion wieder auf. Eine Analyse von Zellkulturproben mittels VenorGeM[®] PCR-Kit zum Nachweis von Mycoplasmen (Firma Minerva Biolabs) zeigte, daß die Kulturen frei von Mycoplasmen waren.

Nachdem wir frische HEK 293-Zellen beim DSMZ bestellt hatten, wurde es uns freundlicherweise ermöglicht, im Institut für Vegetative Physiologie, MHH, für einige Zeit die dortige sterile Werkbank und einen Brutschrank zu benutzen. Auf diese Weise konnten wir die neuen Zellen kultivieren und auch frisches FCS, Penicillin/Streptomycin-Lösung sowie L-Glutamin-Lösung aliquotieren. Die Zellen zeigten normales Wachstumsverhalten und keinerlei Anzeichen für eine Infektion. Sobald jedoch eine Probe in unserem eigenen Zellkulturlabor weitergeführt wurde, traten die unbekanntem Organismen wieder auf. Wir hatten penibel

auf Sauberkeit geachtet, den Brutschrank noch einmal gründlich gereinigt, stets Kittel und Handschuhe getragen sowie Einwegmaterialien benutzt und unter der Werkbank im Institut für Vegetative Physiologie frisch angesetztes Medium sowie frisch geöffnetes PBS verwendet. Daher kamen wir zu dem Schluß, daß die Ursache für die Infektion in unserer Werkbank liegen mußte. Dies wurde durch Tests bestätigt, bei denen offene, mit Medium ohne Antibiotika gefüllte Kulturschalen für 1-2 h unter die eingeschaltete Werkbank gestellt und anschließend geschlossen im Brutschrank inkubiert wurden. Am nächsten Tag fanden sich im Medium zahlreiche Organismen. Kontrollschalen, die geschlossen unter der Werkbank gestanden hatten, waren hingegen am folgenden Tag steril. Dies bewies auch, daß das Medium nicht infiziert war. Die Werkbank wurde ein zweites Mal durch Fachleute einer Begasung unterzogen, was aber zu keiner Verbesserung führte. Die Anschaffung einer neuen Werkbank war für die Abteilung aus finanziellen Gründen nicht möglich. Eine provisorische, doch wirkungsvolle Lösung fand sich durch weitere Versuche von M. Haas (2002), bei denen offene, mit antibiotikafreiem Medium gefüllte Kulturschalen zum einen bei eingeschaltetem Gebläse, zum anderen bei ausgeschaltetem Gebläse für 1-2 h unter die Werkbank gestellt und anschließend im Brutschrank inkubiert wurden. Eine Infektion fand sich nur in solchen Schalen, die bei laufendem Gebläse unter der Werkbank gestanden hatten. Ohne Gebläse blieben die Schalen keimfrei. Daraufhin wird seither bei abgeschaltetem Gebläse unter der Werkbank gearbeitet. In den Zellkulturen ist bisher keine neue Infektion gefunden worden (M. Haas, 2002). Diese Lösung fand sich jedoch erst kurz vor Abschluß meiner praktischen Arbeiten.

3.4 Expression von FOG-1-Fragmenten in *E. coli*

Da das *full length-fog-1* in *E. coli* nicht exprimierbar war, wurden Fragmente des Gens in prokaryontische Expressionsvektoren kloniert. Es war geplant, mit den durch die Expression gewonnenen Proteinfragmente Versuche zu ihrer Bindungsfähigkeit an das c-Myb-Protein wie *Pull Down Assays* oder *Phage Display*-Versuche durchzuführen.

Aus dem von Stuart Orkin erhaltenen Bluescript-Vektor, in den das *fog-1*-Gen nach unbekannter Strategie kloniert worden war, wurde mit *BalI* eine 966 bp lange Sequenz ausgeschnitten. Diese Sequenz kodiert die Aminosäuren 573-895 und damit die Zinkfinger 5-8. Sie wurde in den mit *SmaI* geöffneten pQE31-Vektor eingefügt, da sowohl *BalI* als auch *SmaI*

Blunt ends erzeugt. Nach Überprüfung der Ligation wurden Induktionsversuche (siehe 2.1.1.3) durchgeführt, doch es ließ sich keine Expression des FOG-1-Fragmentes feststellen. Auch der Versuch, eventuell in nur geringer Konzentration vorliegendes Protein über seinen $(\text{His})_6$ -Tag aufzureinigen (siehe 2.3.9), führte zu keinem Ergebnis.

Aus pcDNAFOG-1 wurde mittels *SacI* und *Eco47III* ein 428 bp langes Fragment des fog-1-Gens geschnitten und in den mit *SacI* und *SmaI* geöffneten pQE31-Vektor ligiert. *Eco47III* erzeugt wie *SmaI* *Blunt ends*. Nach der Sequenzierung wurden mit diesem Konstrukt Induktionstests in *E. coli* durchgeführt, doch es ließ sich ebenfalls keine Expression des FOG-1-Fragments feststellen. Eine Behandlung des Zellysats mit Ni^{2+} -NTA-Agarose zur Isolierung darin erhaltener $(\text{His})_6$ -Tag-Proteine erbrachte kein positives Ergebnis.

Das Insert wurde daraufhin in den Vektor pGEX-4T-3 umkloniert. Expressionstests und Versuche, aus den Zellysaten ein GST-Fusionsprotein über GSH-Sepharose zu isolieren (siehe 2.3.8), verliefen negativ.

Als neue Strategie wurde die PCR-Klonierung gewählt. Das Plasmid pcDNAFOG-1 diene als Template. Mittels der Primer 5'ZnFi6neu und 3'ZnFi wurde ein 602 bp langes Segment des fog-1-Gens amplifiziert, das die Aminosäuren 558-758 und damit auch die Zinkfinger 5-6 kodiert. Der Primer 5'ZnFi6neu führt eine *BamHI*-Schnittstelle, der Primer 3'ZnFi eine *EcoRI*-Schnittstelle in das Produkt ein. Nach mehreren Versuchen mit unterschiedlichen Bedingungen wurde unter Verwendung von *Proof Start* DNA-Polymerase und Zusatz von Q-Lösung (Firma Qiagen) mit folgendem PCR-Programm erfolgreich amplifiziert:

	5 min	95°C	Denaturierung
3 Zyklen	40 sek	95°C	Denaturierung
	30 sek	58°C	<i>Annealing</i>
	60 sek	72°C	<i>Elongation</i>
42 Zyklen	40 sek	95°C	Denaturierung
	90 sek	72°C	<i>Annealing</i> und <i>Elongation</i>
	3 min	72°C	<i>Elongation</i>

Auf 4°C abkühlen lassen

Das PCR-Produkt wurde gemäß 2.3.3.2 aufgereinigt und mit *BamHI* und *EcoRI* geschnitten. Nach Auftrennung über eine Agarosegel Elektrophorese und Gelextraktion (siehe 2.3.7.1 und 2.3.3.1) wurde das Produkt in den mit *BamHI* und *EcoRI* geöffneten Vektor pGEX-2T ligiert.

Nach Überprüfung der Klonierung wurde ein Induktionstests durchgeführt. Es ließ sich keine Expression der klonierten fog-1-Sequenz feststellen, eine Aufreinigung des Zellysats über GSH-Sepharose ergab kein Produkt.

Im Verlauf der praktischen Arbeiten habe ich eine weitere Klonierung eines Gen-Segments in einen pGEX-Vektor durchgeführt. Es handelte sich dabei um einen 655 bp langen Abschnitt eines als 5qNCA bezeichneten Gens, der über einen Linker in den Vektor pGEX-2T ligiert wurde. Nach Überprüfung der Klonierung wurde ein positiv verlaufender Induktionstest durchgeführt. Das GST-Fusionsprotein wurde daraufhin in größerem Maßstab exprimiert und über GSH-Sepharose aufgereinigt. Es wurde anschließend erfolgreich von M. Haas (2002) in *Phage Display*-Versuchen eingesetzt.

Da die Expression in *E. coli* als Methode zur Gewinnung von Abschnitten des FOG-1-Proteins nicht zur Verfügung stand, wurde eine weitere Strategie zur Produktion von FOG-1 erprobt.

3.5 *In vitro*-Transkription/Translation

Das TNT® *Quick Coupled Transcription/Translation Systems*-Kit der Firma Promega eröffnete die Möglichkeit, *full length*-Proteine direkt nach Transkription der DNA in einem *Batch*-Verfahren *in vitro* zu translatieren. Dieses Verfahren wurde gemäß 2.3.6.2 auf die Plasmide pcDNAMyb und pHAFOG-1 (siehe 3.6.1) angewandt. Mit den Reaktionsgemischen wurde anschließend eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt. Bei der abschließenden Färbereaktion lies sich auf dem PVDF-Membran keines der Produkte nachweisen. Die parallel durchgeführte Kontrollreaktion mit dem im Kit enthaltenen *Firefly* Luziferase-Gen verlief erfolgreich, es lies sich Luziferase sowohl auf der Western Blot-Membran als auch durch den im Lumaten durchgeführten Luziferase-Assay (siehe 2.2.6.2) nachweisen. Der Versuch wurde mehrmals wiederholt, jedesmal mit negativem Ergebnis (Daten werden nicht gezeigt).

Um festzustellen, ob das Versagen der Reaktion auf den Transkriptionsschritt und die eingesetzte Plasmid-DNA zurückzuführen ist, wurde daraufhin eine *in vitro*-Transkription nach 2.3.6.1 durchgeführt und die Produkte anschließend auf einem Agarosegel analysiert. Es zeigt

ten sich bei allen Proben deutliche RNA-Banden, die *in vitro*-Transkription hat also funktioniert, die Plasmide sind nicht die Ursache für das Versagen der *in vitro*-Transkriptions/Translationsreaktion. Weitere Versuche wurden aufgegeben.

3.6 Isolierung von c-Myb und FOG-1 aus eukaryontischen Zellen

Der Nachweis einer *in vivo*-Interaktion zwischen c-Myb und FOG-1 sollte durch Kotransfektion, Koimmunopräzipitation der Proteine aus den Zellysaten und Nachweis über einen Western Blot erfolgen. Da keine FOG-1-Antikörper zur Verfügung standen, mußte für die Isolierung und zum Nachweis von FOG-1 ein anderes Mittel gefunden werden.

3.6.1 Klonierung eines HA-Tags in den pcDNAFOG-1-Vektor

Der HA-Tag besteht aus einer Sequenz von neun Aminosäuren (YPYDVPDYA), die den Aminosäuren 98-106 des Hämagglutinin (HA) aus dem Humanen Influenza Virus entsprechen und durch spezifische Antikörper erkannt werden. Es wurden zwei als HATag-A und HATag-B (siehe Anhang) bezeichnete komplementäre Oligonukleotide mit der HA-Gensequenz konzipiert, die nach der Hybridisierung zu einer *BamHI*-Schnittstelle kompatible Überhänge ausbildeten. Durch die Ligation dieser DNA-Sequenz in die *BamHI*-Site der MCS von pcDNAFOG-1 wurde die *BamHI*-Erkennungssequenz zerstört, was beim *Screenen* der Klone als Nachweis der erfolgreichen Klonierung diente. Positive Restriktionsspaltungen und PCR-Analysen wurden durch eine Sequenzierung bestätigt. Das Konstrukt pHAFOG-1 wurde im Luziferase-Assay auf seine inhibierende Wirkung in bezug auf die c-Myb-Aktivität hin überprüft und erwies sich als ebenso funktionsfähig wie pcDNAFOG-1. Es wurde daraufhin bei Transfektionen sowohl zur Proteingewinnung als auch für Luziferase-Assays und bei den *in vitro* Transkriptions/Translations-Versuchen eingesetzt.

3.6.2 Nachweis der *in vitro*-Interaktion von c-Myb und FOG-1

3.6.2.1 Immunopräzipitation von c-Myb

Zunächst wurden COS-7-Zellen mit pcDNA-Myb transfiziert, nach zwei Tagen geerntet und einer Zellkernextraktion unterzogen (siehe 2.3.10). Mit den Zellkernextrakten wurde eine SDS-PAGE und ein anschließender Western Blot (siehe 2.3.12) durchgeführt. Es wurde festgestellt, daß die Zellen einer 60 mm-Kulturschale nicht ausreichend c-Myb-Protein erzeugen, um es im Western Blot nachzuweisen. Drei 60 mm-Schalen oder eine 100 mm-Schale enthalten hingegen eine ausreichende Anzahl Zellen, um nachweisbare Mengen von c-Myb zu produzieren (Daten nicht abgebildet).

Der monoklonale Anti-Myb Antikörper 9E11 (siehe 2.3.12.2) wurde wie unter 2.3.11.1 beschrieben an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Mit 10 µl dieser Anti-Myb-AK-Sepharose wurden Zellkernextrakte aus mit pcDNAMyb transfizierten Zellen gemäß 2.3.11.2 behandelt. Anschließend wurde die Sepharose mit Laemmliauftragspuffer (LAP) versetzt und für 10 min auf 95°C erhitzt, um die anhaftenden Proteine zu denaturieren. Mit den Überständen wurde eine SDS-PAGE und ein Westernblot durchgeführt. Auf der Membran ließ sich mit dem Anti-Myb-Antikörper 9E11 anschließend aus den Zellkernextrakten immunopräzipitiertes c-Myb nachweisen. Auf das SDS-Polyacrylamidgel war auch eine Probe des nach der Immunopräzipitation von der Sepharose abgehobenen Überstandes mit aufgetragen worden. In ihm ließ sich durch den Western Blot ebenfalls c-Myb nachweisen, das Protein war also nicht vollständig präzipitiert worden (siehe Abbildung 3.9). Daraufhin wurde in den weiteren Versuchen jeweils 20-40 µl spezifischer Sepharose eingesetzt.

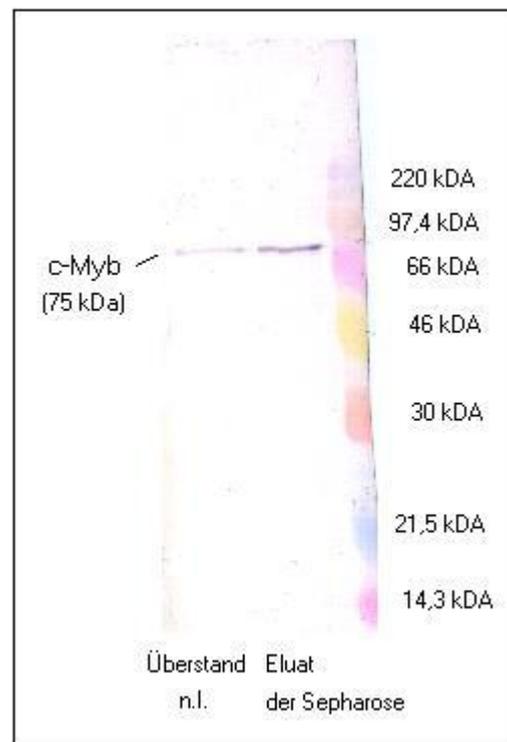


Abb. 3.9 Westernblot nach Immunopräzipitation von c-Myb aus Zellkernextrakten
n.I.: nach der Immunopräzipitation

3.6.2.2 Immunopräzipitation von HA-FOG-1

Ein monoklonaler Anti-HA-Antikörper (Firma Sigma) wurde an die CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt. Die so hergestellte Anti-HA-Sepharose wurde für die Immunopräzipitation des HA-FOG-1-Proteins eingesetzt.

Es wurden COS-7 Zellen in zwanzig 60 mm-Kulturschalen ausgesät. Die Zellen in zehn dieser Schalen wurden am folgenden Tag mit pHAFOG-1 transfiziert. Die anderen zehn Schalen dienten als Negativkontrolle. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, jeweils alle transfizierten und alle nicht transfizierten Zellen vereinigt und Zellkernextraktionen durchgeführt. Beide Zellkernextrakte wurden mit je 20 µl Anti-HA-Sepharose behandelt. Nach der Immunopräzipitation wurden die Überstände abpipettiert, jeweils eine Probe entnommen, mit LAP versetzt und zur Denaturierung 10 min auf 95°C erhitzt. Die beiden Sepharoseproben wurde nach dem Waschen jeweils ebenfalls mit LAP erhitzt (10 min, 95°C).

Anschließend wurde mit allen Proben eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt. Auf der Membran ließ sich in dem aus transfizierten Zellen gewonnenen Zellkernextrakt mit dem Anti-HA-Antikörper das HA-FOG-1-Protein nachweisen. Der größte Anteil war durch die Anti-HA-Sepharose präzipitiert worden, ein geringer Anteil befand sich noch im Präzipitationsüberstand.

In der Negativkontrolle

wurde kein HA-FOG-1 nachgewiesen (siehe Abbildung 3.10).

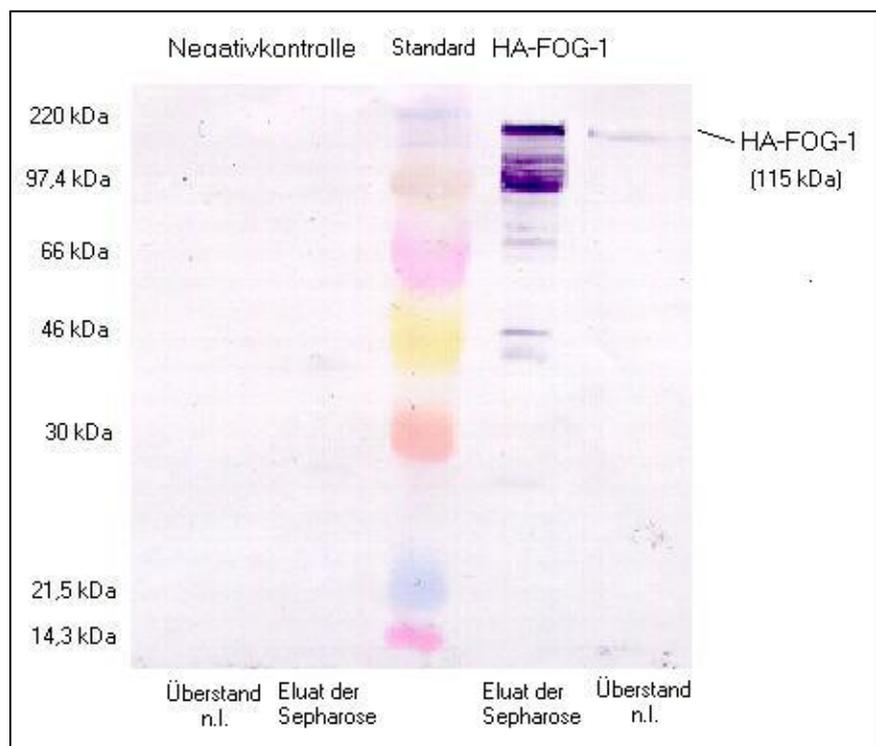


Abb. 3.10: Western Blot nach Immunopräzipitation von HA-FOG-1 aus Zellkernextrakten
n.I.: Nach Immunopräzipitation

3.6.2.3 Koimmunopräzipitation von c-Myb und HA-FOG-1

Für die Koimmunopräzipitation wurde statt pcDNAMyb das pEd.FcMyb Plasmid zur Transfektion eingesetzt, da es eine deutlich höhere Expressionsrate erzielt als der pcDNA-Vektor. C-Myb wird hieraus als Fc-Fusionsprotein erhalten. Es wurden zwei 100 mm-Schalen COS-7-Zellen jeweils mit pEd.FcMyb und pHAFOG-1 in stöchiometrischem Verhältnis kotransfiziert. Zwei weitere Schalen dienten als Negativkontrolle. Nach der Ernte wurden die Zellen verschiedener Schalen nicht vereinigt, sondern getrennt einer Zellkernextraktion unterzogen. Anschließend wurden Immunopräzipitationen durchgeführt. Dabei wurden jeweils ein Zellkernextrakt transfizierter Zellen und eine Negativkontrolle mit Anti-Myb-AK-Sepharose, die anderen beiden Zellkernextrakte mit Anti-HA-Ak-Sepharose behandelt. Nach der Immunopräzipitation wurden von den Überständen Proben entnommen und mit LAP bei 95°C denaturiert (10 min). Die vier Sepharoseproben wurden mit LAP ebenfalls bei 95°C für 10 min erhitzt. Dann wurden die Proben auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der SDS-PAGE wurde ein Western Blot durchgeführt. Vor der Behandlung mit dem spezifischen Antikörper wurde die Membran entlang der Spur des Standards durchgeschnitten. Die linke Hälfte, auf der sich die mit Anti-Myb-AK-Sepharose immunopräzipitierten Proben befanden, wurde mit Anti-HA-Antikörper inkubiert, um mit c-Myb kopräzipitiertes HA-FOG 1 nachzuweisen. Die rechte Hälfte der Membran trug die mit Anti-HA-Sepharose immunopräzipitierten Proteine. Sie wurde mit Anti-Myb-Antikörper inkubiert, um mit HA-FOG 1 kopräzipitiertes c-Myb nachzuweisen. Nach der Inkubation mit dem zweiten Antikörper und der Färbereaktion wurde das in Abbildung 3.11 dargestellte Ergebnis erhalten.

In den durch Immunopräzipitation mit Anti-Myb-AK-Sepharose gewonnenen Proben konnte mit c-Myb kopräzipitiertes HA-FOG-1 nachgewiesen werden. Umgekehrt ließ sich in den durch Immunopräzipitation mit Anti-HA-AK-Sepharose gewonnenen Proben c-Myb nachweisen, das mit HA-FOG-1 kopräzipitiert wurde. Dieses Ergebnis weist auf eine direkte Interaktion zwischen den Proteinen c-Myb und HA-FOG-1 hin. Die in der Abbildung zu erkennenden Nebenbanden, die jeweils unterhalb der HA-FOG-1-Bande auftreten, werden durch Zerfallsprodukte des Proteins hervorgerufen.

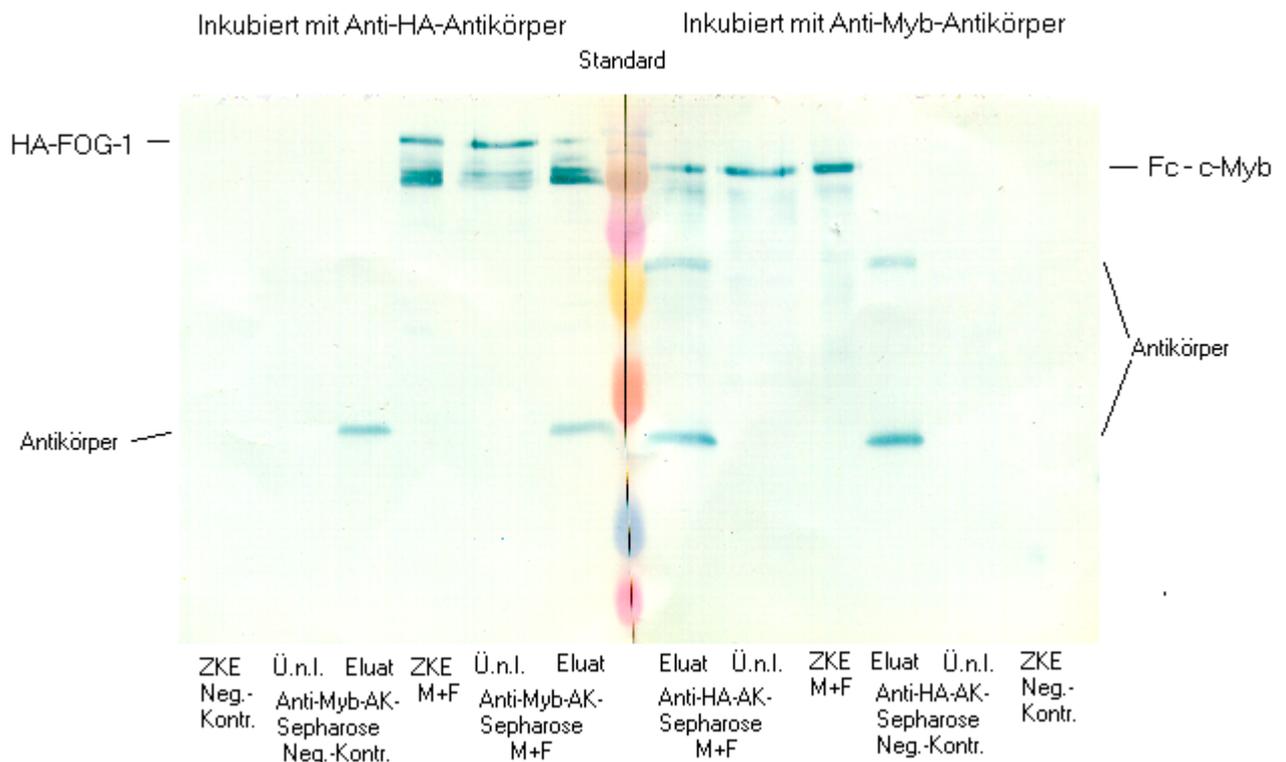


Abb. 3.11: Westernblot nach Koimmunopräzipitation von c-Myb und HA-FOG-1 aus Zellkernextrakten mit Anti-Myb-AK-Sepharose (linke Membranhälfte) und Anti-HA-AK-Sepharose (rechte Membranhälfte)

Neg.-Kontr.: Negativ-Kontrolle (Zellkernextrakte aus nicht transfizierten Zellen)
 ZKE: Zellkernextrakt (unbehandelt)
 Ü.n.I.: Überstand nach der Immunopräzipitation
 M+F: c-Myb + FOG-1

Im darauf folgenden folgenden Versuch wurden parallel zu der oben beschriebenen Immunopräzipitation zwei weitere Zellkernextrakte aus mit pEd.Fc-Myb und pHAFOG-1 kotransfizierten Zellen gewonnen und mit Sepharose behandelt, deren aktive Gruppen durch Tris-Puffer blockiert worden waren (siehe 2.3.11.1). Dies geschah, um sicherzustellen, daß die auf der Western Blot-Membran gefundenen Proteine tatsächlich mit ihrem Wechselwirkungspartner kopräzipitiert und nicht unspezifisch präzipitiert worden waren. Eines der Eluate aus der geblockten Sepharose wurde anschließend nach dem Western Blot mit Anti-Myb-Antikörper, das andere mit Anti-HA-Antikörper inkubiert. Nach der Immunopräzipitation wurden in den Spuren dieser Eluate schwache Banden gefunden. Es wurde in weiteren Versuchen angestrebt, diese Erscheinung durch zusätzliche Waschschritte zurückzudrängen. Die inzwischen aufgetretene Infektion der Zellkultur (siehe 3.3) störte jedoch offenbar die Expression von c-Myb und HA-FOG-1. C-Myb ließ sich später, nachdem der Arbeitsgruppe neue, mycoplasmenfreie COS-7-Zellen vom Institut für Pharmakologie zur Verfügung gestellt worden waren, wieder

exprimieren und im Western Blot nachweisen. HA-FOG-1 ließ sich jedoch trotz wiederholter Versuche bis zum Ende der praktischen Arbeiten nicht mehr im Zellkernextrakt mit pHA-FOG-1 transfizierter Zellen nachweisen. Daher war es nicht möglich, die Koimmunopräzipitation von c-Myb und HA-FOG-1 zu reproduzieren.

3.7 Abhängigkeit der Expression von c-Myb von der Zelldichte

Im Verlauf der c-Myb-Expressionsversuche in COS-7-Zellen ließ sich beobachten, daß zwar mit steigender Zellzahl wie zu erwarten auch die Menge gewonnenen c-Mybs anstieg, bei zu großer Zelldichte aber die Expression von c-Myb wieder abzunehmen schien. Dies ließ sich zunächst rein optisch anhand der Intensitäten der Banden auf der Western Blot-Membran abschätzen. Diesem Phänomen wurde in weiteren Versuchen nachgegangen. Es wurden unterschiedliche Anfangszahlen von COS-7 ($0,3 \times 10^6$, $0,8 \times 10^6$, $1,3 \times 10^6$ sowie $1,8 \times 10^6$ Zellen pro Schale) in verschiedene 100 mm-Kulturschalen ausgesät und parallel mit pEd.FcMyb transfiziert. Nach der Ernte wurden Zellkernextraktionen durchgeführt. Je 20 μ l der Zellkernextrakte wurden direkt einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot unterzogen. Nach der Färbereaktion ließ sich auf der Membran erkennen, daß bei der durch die Aussaat von $1,8 \times 10^6$ Zellen/Kulturschale erzeugten Zelldichte die Expression von c-Myb offenbar einer Hemmung unterliegt (siehe Abbildung 3.12).

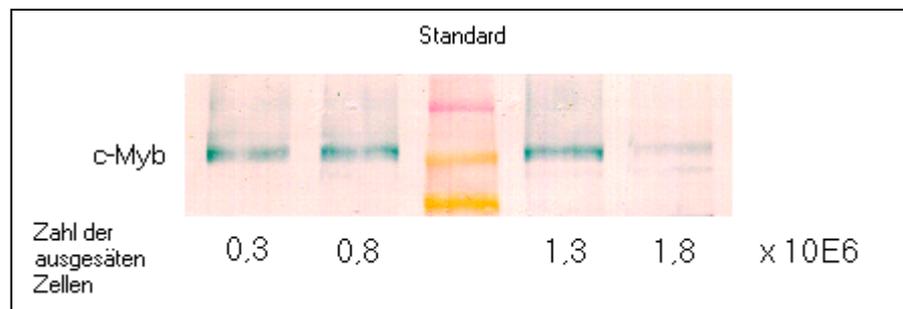


Abb. 3.12: Abhängigkeit der c-Myb-Expression von der Zelldichte
Western Blot mit Zellkernextrakten aus vier unterschiedlich dicht mit COS-7-Zellen besäten Kulturschalen, an denen parallel Transfektionen mit pEd.FcMyb durchgeführt wurden.
10E6: 10^6

Da die ausgesäte Zellzahl und das Zellwachstum von Versuch zu Versuch Schwankungen unterliegt, und um die mit steigender Zellzahl steigende Gesamt-Proteinmenge im Zellkernextrakt zu berücksichtigen, wurde eine Normierungsmethode eingeführt. Aus einem Teil der Zellkernextrakte wurden Proben entnommen und um den Faktor 1.000 mit deionisiertem

Wasser verdünnt. Mittels einer Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 2.3.13) wurde der Gesamtproteingehalt in diesen Proben bestimmt. Die Western Blot-Membranen wurden eingelezen und die Bandenintensität mit Hilfe des Computerprogrammes Win Easy ausgewertet. Die erhaltenen Daten wurden über den jeweils zugehörigen Gesamtproteingehalt normiert.

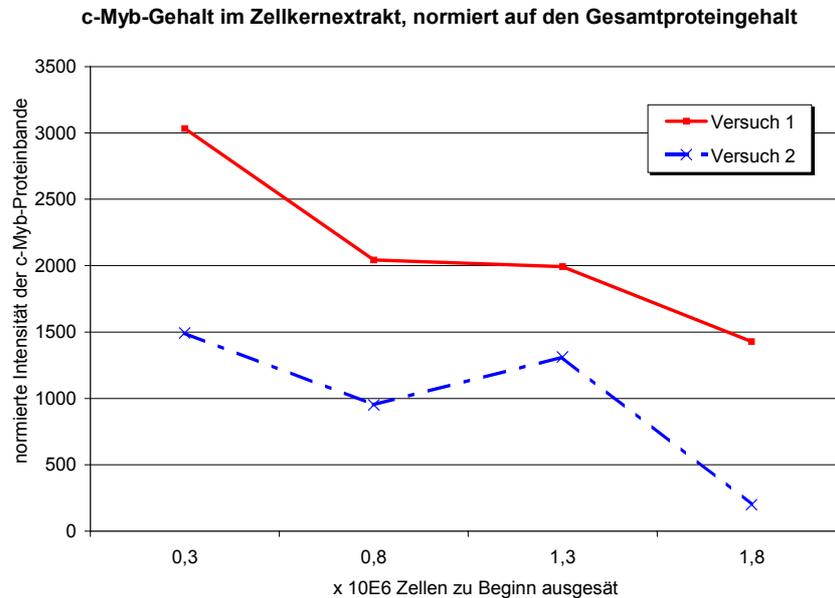


Abb. 3.13: Abhängigkeit der c-Myb-Expression von der Zelldichte

Wie der Abbildung 3.13 zu entnehmen ist, sinkt der c-Myb-Gehalt im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt im Zellkernextrakt mit steigender Zahl ausgesäter Zellen. Die c-Myb-Expression ist demnach abhängig von der Zelldichte und wird bei zu hoher Konfluenz gehemmt. Dieses Phänomen wurde ebenfalls für die Transfektion mit pcDNAMyb gefunden, ist also nicht vom Vektor abhängig.

4. Zusammenfassung und Diskussion

Die erste Aufgabe dieser Dissertation bestand in der Isolierung des *full-length-fog-1*-Gens und der Klonierung in einen eukaryontischen Expressionsvektor. Nach mehreren erfolglosen Versuchen gelang es, das *fog-1*-Gen aus einem von S. H. Orkin (Children's Hospital, Harvard University, Boston, USA) zur Verfügung gestellten Plasmid zu isolieren und in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA1.1/Amp zu ligieren. Das so generierte pcDNAFOG-1-Plasmid wurde erfolgreich in verschiedenen Transfektionen für Reportergen-*Assays* eingesetzt. Es diente ferner als Template für PCR-Reaktionen und als Ausgangsmaterial für weitere Klonierungen.

In Reportergen-*Assays* wurde der Einfluß von FOG-1 und von C/EBP α auf die Transaktivierungsaktivität von c-Myb untersucht. Hierbei wurde der synergetische Effekt zwischen c-Myb und C/EBP α bestätigt. Es zeigte sich, daß FOG-1 einen starken, negativ regulierenden Einfluß auf die Aktivität sowohl von c-Myb als auch des c-Myb-C/EBP α -Komplexes ausübt. Diese inhibitorische Wirkung erfolgt dosisabhängig.

Aus der Literatur ist bekannt, daß c-Myb und GATA-1 den Kofaktor CBP binden, aber keinen ternären Komplex ausbilden. Der GATA-1 Kofaktor FOG-1 inhibiert im Reportergen-*Assay* die Transaktivierungsaktivität von c-Myb. Dies könnte so interpretiert werden, daß FOG-1 eine Umschaltfunktion zwischen dem myeloiden und erythroiden Differenzierungsweg ausübt.

Anhand von Deletionsmutanten konnte in Reportergen-*Assays* gezeigt werden, daß die zuerst gefundenen Interaktionsdomänen, der C-Terminus von c-Myb und der 6. Zinkfinger von FOG-1, nicht essentiell für die inhibierende Wirkung von FOG-1 auf die Aktivität von c-Myb sind. Weder die Deletion des C-Terminus des c-Myb-Proteins noch die Deletion des 6. Zinkfingers aus FOG-1 verminderten die Inhibition. Daraus ist zu schließen, daß auch andere Domänen beider Proteine beteiligt sein müssen.

Die Deletion der Zinkfinger 1-4 erbrachte ebenfalls keine Verminderung der inhibierenden Wirkung von FOG-1 auf c-Myb, ebensowenig die zusätzliche Deletion des Zinkfingers 6. Offensichtlich reichen die verbleibenden vier Zinkfinger 5, 7, 8 und 9 aus, um die Funktionsfähigkeit von FOG-1 in dieser Hinsicht zu erhalten.

Der Vergleich der neun Zinkfinger des FOG-1-Proteins zeigt, daß vier von ihnen homolog sind. Diese vier Zinkfinger gehören dem Cys-Cys:His-Cys-Typus an und können an GATA-1

binden. Die größte Ähnlichkeit besteht zwischen den drei Zinkfingern 1, 6 und 9, die die höchste Bindungsaffinität zu GATA-1 besitzen. Der Zinkfinger 5 zeigt schon einige Abweichungen, die Homologie des nicht mit GATA-1 interagierenden Cys-Cys:His-Cys-Zinkfingers 7 zu Zinkfinger 6 beschränkt sich auf die Anordnung der das Zink-Ion bindenden Aminosäurereste. Nach den Untersuchungen von (Fox *et al.*, 1999) erstreckt sich die Homologie der vier Zinkfinger 1, 5, 6 und 9 auch darauf, daß sie alle spezifisch an den N-terminalen Zinkfinger von GATA-1 binden. Mutationsversuche zeigten, daß FOG-1 sowohl für die Aktivierung der Genexpression in Kooperation mit, als auch für die Repression der Aktivität von GATA-1 alle vier Zinkfinger 1, 5, 6 und 9 benötigt, und daß seine Fähigkeit, diese Aufgaben zu erfüllen, mit der Anzahl der funktionsfähigen ZnFi aus dieser Gruppe sinkt.

Möglicherweise sind es auch die Zinkfinger 1, 5, 6 und 9, die den Kontakt zu c-Myb ausbilden. Die Deletion der Zinkfinger 1 und 6 lassen nämlich noch zwei zur Interaktion fähige Zinkfinger bestehen. Weitere Versuche hierzu konnten jedoch aufgrund der Infektion der Zellkultur nicht mehr durchgeführt werden.

Ein weiteres Ziel war es, die *in vivo*-Interaktion von c-Myb und FOG-1 durch Koimmunopräzipitation nachzuweisen. Hierzu stand zwar ein Anti-Myb- aber kein Anti-FOG-1-Antikörper zur Verfügung. Daher mußte das FOG-1-Protein auf andere Weise präzipitierbar und detektierbar gemacht werden. Zu diesem Zweck wurde ein Hämagglutinin (HA)-Tag in den pcDNAFOG-1-Vektor kloniert. Mit diesem Vektor transfizierte Zellen exprimieren ein HA-FOG-1-Fusionsprotein, das von einem spezifischen Anti-HA-Antikörper erkannt wird. In Reporter-*Assays* erwies sich pHAFOG-1 als ebenso wirkungsvoll gegenüber c-Myb wie pcDNAFOG-1. Der Vektor pHAFOG-1 wurde daher als Ausgangsmaterial für die fog-1-Deletionsmutanten verwendet.

Durch Kopplung der entsprechenden Antikörper an CNBr-aktivierte Sepharose wurde Anti-Myb- bzw. Anti-HA-Sepharose hergestellt. Mit dieser Sepharose ließen sich die Proteine c-Myb und HA-Fog zunächst einzeln aus den Zellkernextrakten mit pEd.FcMyb bzw. pHA-FOG-1 transfizierter COS-7-Zellen immunopräzipitieren und auf dem Western Blot nachweisen. Nach Kotransfektion der beiden Plasmide ließen sich c-Myb und HA-FOG-1 aus den Zellkernextrakten koimmunopräzipitieren. Nach Immunopräzipitation mit Anti-Myb-Sepharose ließen sich auf dem Western Blot HA-FOG-1, nach Immunopräzipitation mit Anti-HA-Sepharose c-Myb detektieren. Durch diese Koimmunopräzipitation konnte die *in vivo*-Interaktion von c-Myb und FOG-1 nachgewiesen werden. Allerdings wurden in Kontrollversuchen mit durch Tris-Puffer blockierter Sepharose schwächere Signale für eine unspezifische Präzipitation der beiden Proteine gefunden. Wegen der Infektion der Zellkultur war es nicht

möglich, die Koimmunopräzipitation zu reproduzieren, noch einen Weg zu finden, die unspezifische Präzipitation zurückzudrängen. Daher sollten die Ergebnisse nicht als eindeutiger Beweis, sondern als Indiz für die Interaktion von c-Myb und FOG-1 bewertet werden. Es war geplant, mit den pHAFOG-1 Deletionsmutanten ähnliche Immunopräzipitationsversuche durchzuführen, was wegen der Infektion der Zellkultur nicht verwirklicht werden konnte.

Im Verlauf der Versuche, das c-Myb-Protein über einen Western Blot in den Zellkernextrakten c-myb-transfizierter COS-7-Zellen nachzuweisen, zeigte sich ein reziproker Zusammenhang zwischen der Dichte der transfizierten Zellen und der Intensität der auf dem Western Blot gefundenen c-Myb-Banden. Daher wurden an unterschiedlich dicht gesäten COS-7-Zellen parallele Transfektionsversuche mit pEd.FcMyb durchgeführt. Die Zellkernextrakte wurden über Western Blots analysiert, ihr Gesamtproteingehalt nach Bradford bestimmt. Nach Auswertung der Intensitäten der auf den Western Blot-Membranen erhaltenen c-Myb-Banden und Normierung nach dem Gesamtproteingehalt des jeweiligen Zellkernextraktes ließ sich ein Zusammenhang zwischen Zelldichte und c-Myb-Gehalt im Zellkernextrakt herstellen. Je höher die Konfluenz der Zellen, desto geringer ist der Gehalt an c-Myb im Zellkernextrakt bezogen auf den Gesamtproteingehalt. Die c-Myb-Expression in COS-7-Zellen ist reziprok vom Grad der Konfluenz abhängig. Dieses Phänomen wurde sowohl für pEd.FcMyb als auch für pcDNAMyb gefunden, ist also nicht vektorspezifisch.

Normalerweise wird c-Myb vor allem in wenig differenzierten Zellen exprimiert. Mit steigendem Differenzierungsgrad der Zelle wird die c-Myb-Expression herunterregelt. COS-7-Zellen sind ausdifferenzierte Affen-Nierenzellen, die jedoch durch virale DNA transformiert und so in ihren Eigenschaften verändert wurden. Sie können sich unbegrenzt teilen und altern nicht. Bei nahezu vollständiger Konfluenz erliegen sie jedoch einer Kontaktinhibition. Möglicherweise üben die bei steigender Zelldichte auftretenden intrazellulären Streßsignale eine inhibierende Wirkung auf die Expression des zellfremden c-myb-Genes aus.

5. Ausblick

Die Untersuchungen einer amerikanischen Forschergruppe (Fox *et al.*, 1999) ergaben, daß FOG-1 zwar bei der Aktivierung des Hämatopoese-spezifischen p45 nf-e2-Gens mit GATA-1 synergisiert, an anderen Promotoren aber auf die Aktivität von GATA-1 repressiv wirken kann. P45 NF-E2 ist eine Untereinheit des für die Ausreifung von Megakaryozyten essentiellen NF-E2-Proteins, das wie GATA-1 erst in fortgeschrittenem Stadium der Entwicklung dieser Zellen benötigt wird. Bei Fehlen von FOG-1 kommt die Entwicklung der megakaryozytische Zelllinie schon in einem früheren Stadium zum Stillstand, was auf eine GATA-1 unabhängige Funktion von FOG-1 in dieser Phase schließen läßt (Tsang, *et al.*, 1998; Shivdasani, 2001). Auch in der Erythropoese synergisiert FOG-1 erst in einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium der Zellen mit GATA-1. Es sind Hinweise gefunden worden, daß FOG-1 in Vorläuferzellen repressiv auf die Aktivität von GATA-1 in bezug auf die Induktion der erythroiden Zelllinie wirkt, möglicherweise um die Zahl der entstehenden Erythrozyten zu limitieren und so die Erschöpfung pluripotenter Stammzellen zu verhindern (Deconinck *et al.*, 2000). Ferner wurde festgestellt, daß GATA-1 sowohl als Aktivator als auch Repressor des eosinophil-spezifischen EOS47-Promotors agieren kann. In hohen Konzentrationen wirkt GATA-1 inhibierend, in niedrigen Konzentrationen hingegen aktiviert es den EOS47-Promoter, wobei es mit den Proteinen Ets-1, C/EBP α und c-Myb kooperiert. Die Interaktion zwischen GATA-1, Ets-1 und C/EBP α könnte hierfür essentiell sein. Es wird vermutet, daß durch die Expression von GATA-1 und die daraus folgende Aktivierung oder Inhibierung des EOS47-Promotors die Differenzierung in Richtung eosinophiler oder myeloider Zellen gesteuert wird (McNagny *et al.*, 1998). Untersuchungen verschiedener Forschungsgruppen haben gezeigt, daß das Protein CBP als Kofaktor sowohl mit c-Myb (Oelgeschläger *et al.*, 1996) als auch mit GATA-1 (Blobel *et al.*, 1998) synergisiert und die Transaktivierungsaktivität beider Proteine erheblich steigert. C-Myb und GATA-1 binden beide an CBP, ein ternärer Komplex kann sich jedoch nicht ausbilden. Dies führte zu der Vermutung, daß CBP eine Umschaltfunktion zwischen myeloiden und erythroiden Zelllinien zukommt (Takahashi *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden durch Koimmunopräzipitation von c-Myb und FOG-1 ein Indiz für eine *in vivo*-Interaktion der beiden Proteine gefunden. Zukünftige Versuche sollten darauf abzielen, dieses Ergebnis zu reproduzieren und zu erhärten. In Reporter-*Assays* konnte eine inhibierende Wirkung von FOG-1 auf die Transaktivierungsaktivität von c-Myb nachgewiesen werden. Die mögliche Umschaltfunktion von FOG-1 könnte durch Transfek-

tionen an differenzierbaren Zellen überprüft werden. Durch FACS-Messungen ließen sich Veränderungen des Phänotyps dieser Zellen unter dem Einfluß von c-Myb allein und c-Myb und FOG-1 in Kombination detektieren.

Anhand von Deletionsmutanten wurde in dieser Arbeit versucht, die Wechselwirkungsdomänen von c-Myb und FOG-1 zu charakterisieren. Nach Deletion der Zinkfinger 1-4 und 6 von FOG-1 zeigte sich kein Nachlassen der inhibitorischen Wirkung des Proteins auf die Transaktivierungsaktivität von c-Myb. Als nächster Schritt war die Deletion des neunten Zinkfingers geplant, um festzustellen, ob FOG-1 auch ohne diesen Zinkfinger noch zur Inhibierung von c-Myb fähig ist. Der in diesem Fall verbleibende Zinkfinger 5 zeigt wenig, die Zinkfinger 7 und 8 zeigen keine Bindung an GATA-1. Daher können sie möglicherweise auch keinen ausreichenden Kontakt zu c-Myb ausbilden. Im Rahmen zukünftiger Arbeiten werden diese und weitere Deletionsmutanten sowie Vektoren, die nur bestimmte Abschnitte des *fog-1*-Gens enthalten, erstellt. Anhand von Transfektionsversuchen für Reporter-*Assays* sollte die inhibitorische Wirkung dieser Mutanten auf die Transaktivierungsaktivität von c-Myb überprüft werden, um die für die Interaktion essentiellen Domänen des FOG-1-Proteins einzugrenzen. Durch Erstellung weiterer c-Myb-Deletionsmutanten ließen sich auch die Interaktionsdomänen dieses Proteins näher charakterisieren. Koimmunopräzipitationsversuche mit den verschiedenen FOG-1- und c-Myb-Mutanten und den *full length*-Proteinen werden die Ergebnisse der Charakterisierung untermauern.

6. Literaturverzeichnis

- Akimaru, H., Chen, Y., Dai, P., Hou, D.X., Nonaka, M., Smolik, S.M., Armstrong, S., Goodman, R.H. and Ishii, S. (1997) Drosophila CBP is a co-activator of cubitus interruptus in hedgehog signalling. *nature*, **386**, 735-738.
- Arias, J., Alberts, A.S., Brindle, P., Claret, F.X., Smeal, T., Karin, M., Feramisco, J. and Montminy, M. (1994) Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor. *nature*, **370**, 226-229.
- Biolabs, N.E. (1996) The NEB Transcript, **6**
- Birnboim H.C. (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.*, **100**, 243-255
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1522
- Blobel, G.A., Tishihiro, N., Eckner, R., Montminy, M. and Orkin, S.H. (1998) CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. *Biochemistry*, **95**, 2061-2066
- Bortner, D. and Ostrowski, M. (1991) Analysis of the v-myb structural components important for transactivation of gene expression. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1533-1539.
- Caracciolo, D., Venturalli, D., Valtieri, M., Peschle, C., Gewirtz, A.M. and Calabretta, B. (1990) Stage-related proliferative activity determines c-myb functional requirements during normal human hematopoiesis. *J. Clin. Invest.*, **85**, 55-61
- Chrivia, J.C., Kwok, R.P.S., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R. and Goodman, R.H. (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *nature*, **365**, 855-858.
- Clarke, M.F., Kukowska-Latallo, J.F., Westin, E., Smith, M. and Prochownik, E.V. (1988) Constitutive expression of a c-myb cDNA blocks Friend murine erythroleukemia cell differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 884-892
- Clontech Laboratories Inc. (1996), λ TriplexTM Library User Manual (PT3003-1)
- Clontech Laboratories Inc. (1999), MercuryTM Pathway Profiling System User Manual (PT3286-1, PR98814)

- Dash, A.B., Orrico, F.C. and Ness, S.A. (1996) The EVES motif mediates both intermolecular and intramolecular regulation of c-Myb. *Genes & Development*, **10**, 1858-1869.
- Dasgupta, P. and Reddy, P. (1989) Identification of alternatively spliced transcripts for human c-myb: molecular cloning and sequence analysis of human c-myb exon 9A sequences. *Oncogene*, **4**, 1419-1423
- Deconinck, A.E., Mead, P.E., Tevosian, S.G., Crispino, J.D., Katz, S.G., Zon, L.I. and Orkin, S.H. (2000) FOG acts as a repressor of red blood cell development in *Xenopus*. *Development*, **127**, 2031-2040
- Dubendorff, J.W., Whittaker, L.J., Eltman, J.T. and Lipsick, J.S. (1992) Carboxy-terminal elements of c-Myb negatively regulate transcriptional activation in cis and in trans. *Genes & Development*, **6** 2524-2535
- Ebnet, A., Schweers, O., Thole, H., Fagin, U., Urbanke, C., Maass, G. and Wolfes, H. (1994) Biophysical characterization of the c-Myb DNA-binding domain. *Biochemistry*, **33**, 14586-14593
- Eckner, R., Ewen, M.E., Newsome, D., Gerdes, M., DeCaprio, J.A., Bentley-Lawrence, J. and Livingston, D. (1994) Molecular cloning and functional analysis of adenovirus E1A associated 300kDa Protein (p300) reveals a protein with the properties of a transcriptional adapter. *Genes & Development*, **8**, 869-884.
- Fearon, E.R. and Vogelstein, B. (1990) A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*, **61**, 759-767
- Fossett, N., Tevosian, S.G., Gajewski, K., Zhang, Q., Orkin, S.H. and Schulz, R.A. (2001) The Friend of GATA proteins U-shaped, FOG-1, and FOG-2 function as negative regulators of blood, heart, and eye development in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **98**, 7342-7347
- Fox, A.H., Liew, C., Holmes, M., Kowalski, K., Mackay, J. and Crossley, M. (1999) Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *EMBO J.*, **18**, 2812-2822
- Fu, S.L. and Lipsick, J.S. (1996) FAETL motif required for leukemic transformation by v-Myb. *J. Virol.*, **70**, 5600-5610.
- Golay, J., Capucci, A., Arsura, M., Castellano, M., Rizzo, V. and Introna, M. (1991) Expression of c-myb and B-myb, but not A-myb, correlates with proliferation in human hematopoietic cells. *Blood*, **77**, 149-158

- Golay, J., Cusmano, G. and Introna, M. (1992) Independent regulation of c-myc, B-Myb, and c-myb expression by inducers and inhibitors of proliferation in human B lymphocytes. *J. Immunol.*, **149**, 300-308
- Gonda, T.J., Gough, N.M., Dunn, A.R. and de Blaquiére, J. (1985) Nucleotide sequence of cDNA clones of the murine myeloid leukemia. *nature*, **310**, 249-251
- Gonda, T.J. and Metcalf, D. (1984) Expression of myb, myc and fos proto-oncogenes during the differentiation of a murine myeloid leukemia. *nature*, **310**, 249-251
- Gozes, I., Nakai, H., Byers, M., Avidor, R., Weinstein, Y., Shani, Y. and Shows, T.B. (1987) Sequential expression in the nervous system of c-myb and VIP genes, located in human chromosomal region 6q24. *Somat. Cell Mol. Genet.*, **13**, 305-313
- Graf, T., (1998) Leukemogenesis: Small differences in Myb have large targets. *Current Biology*, **8**, R353-R355
- Haas, M. (2002) Persönliche Mitteilungen
- Hall, W.J., Bean, C.W. and Pollard, M. (1941) A viral disease in chicken. *Am. J. Vet. Res.*, **2**, 272-279
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of E. coli with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- Howe, K.M. and Watson, R.J. (1991) Nucleotide preferences in sequence-specific recognition of DNA by c-myb protein. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 3913-3919
- Hu, Y.L., Ramsay, R.G., Kanei-Ishii, C., Ishii, S. and Gonda, T.J. (1991) Transformation by carboxyl-deleted Myb reflects increased transactivating capacity and disruption of a negative regulatory domain. *Oncogene*, **6**, 1549-1553.
- Ibelgaufits, H. *Gentechnologie von A bis Z*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Bundesrepublik Deutschland (1990).
- Ivanov, X., Mladenov, Z., Nedyalkov, S. and Todorov, T.G. (1962) *Bull. Inst. Pathol. Comp. Animaux*, **9**, 5-36
- Kalkbrenner, F., Guehmann, S. and Moelling, K. (1990) Analysis of transcriptional activation by human c- myb and v- myb genes. *Oncogene*, **5**, 0-0.
- Kanei-Ishii, C., MacMillan, E.M., Nomura, T., Sarai, A., Ramsay, R.G., Aimoto, S., Ishii, S. and Gonda, T.J. (1992) Transactivation and transformation by Myb are negatively regulated by a leucine-zipper structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **89**, 3088-3092.

- Kiewitz, A. and Wolfes, H. (1997) Mapping of protein-protein interactions between c-myb and its coactivator CBP by a new phage display system. *FEBS Letters*, **415**, 258-262
- Kowalski, K., Czolij, R., King, G.F., Crossley, M. & Mackay, J.P. (1999) The solution structure of the N-terminal zinc finger of GATA-1 reveals a specific binding face for the transcriptional co-factor FOG. *Journal of Biomolecular NMR*, **13**, 249-262
- Kwok, R.P.S., Lundblad, J.R., Chrivia, J.C., Richards, J.P., HP, B.c., Brennan, R.G., Roberts, S.G.E., Green, M.R. and Goodman, R.H. (1994) Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *nature*, **370**, 223-226.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural protein during assembly of the head of the bacteriophage T4. *nature*, **227**, 680-682
- Lane, T., Ibanez, C., Garcia, A., Graf, T. and Lipsick, J. (1990) Transformation by v- myb correlates with trans- activation of gene expression. *Molec. Cell. Biol.*, **10**, 2591-2598.
- Lipsick, J.S. (1996) One billion years of Myb. *Oncogene*, **13**, 223-235
- Lüscher, B., Christenson, E., Litchfield, D.W., Krebs, E.G. and Eisenman, R.N. (1990) Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation. *nature*, **344**, 517-522.
- Lüscher, B. and Eisenman, R.N. (1992) Mitosis-specific phosphorylation of the nuclear oncoproteins Myc and Myb. *J. Cell Biol.*, **118**, 775-784.
- Mackay, J.P. and Crossley, M. (1998) Zinc fingers are sticking together. *TIBS*, **23**, 1-4
- Majello, B., Kenyon, L.C. and Dalla-Favera, R. (1986) Human c-myb protooncogene: nucleotide sequence of cDNA and organization of the genetic locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **83**, 9636-9640
- McClinton, D., Stafford, J., Brents, L., Bender, T.P. and Kuehl, W.M. (1990) Differentiation of mouse erythroleukemia cells is blocked by late up-regulation of a c-myb transgene. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 705-710
- McIntosh, P.B., Frenkiel, T.A., Wollborn, U., McCormick, J.E., Klempnauer, K.H., Feeney, J. and Carr, M.D. (1998) Solution structure of the B-Myb DNA-binding domain: A possible role for conformational instability of the protein in DNA-binding and control of gene expression. *Biochemistry*, **37**, 9619-9629
- McNagny, K.M., Sieweke, M.H., Döderlein, G., Graf, T. and Nerlov, C. (1998) Regulation of eosinophil-specific gene expression by a C/EBP-Ets complex and GATA-1. *EMBO J.*, **17**, 3669-3680

- Minerva Biolabs GmbH (2001) VenorGeM[®] Instruction Manual for Mycoplasma PCR Detection Trial Kit
- Mink, S., Haenig, B., and Klempnauer, K.H., (1997) Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPbeta. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 6609-6617.
- Mucenski, M.L., McLain, K., Kier, A.B., Swerdlow, S.H., Schreiner, C.M., Miller, T.A., Pietryga, D.W., Scott, W.J., Jr. and Potter, S.S. (1991) A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis. *Cell*, **65**, 677-689
- Ness, S.A. (1996) The Myb oncoprotein: regulating a regulator. *Biochim. Biophys. Acta*, **1288**, 123-139
- Ness, S.A. (1999) Myb binding proteins: regulators and cohorts in transformation. *Oncogene*, **18**, 3039-3046
- Ness, S., Marknell, A. and Graf, T. (1989) The v- myb oncogene product binds to and activates the promyelocyte- specific mim- 1 gene. *Cell*, **59**, 1115-1125.
- Ness, S.A., Kowenz-Leutz, E., Casini, T., Graf, T. and Leutz, A. (1993) Myb and NF-M: Combinatorial activators of myeloid genes in heterologous cell types. *Genes & Development*, **7**, 749-759.
- Nichols, K.E., Crispino, J.D., Poncz, M., White, J.G., Orkin, S.H., Maris, J.M. & Weiss, M.J. (2000) Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA-1. *nature genetics*, **24**, 266-270
- Nicolaidis, N.C., Gualdi, R., Casadevall, C., Manzella, L. and Calabretta, B. (1991) Positive autoregulation of c-myb expression via Myb binding sites in the 5' flanking region of the human c-myb gene. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 6166-6176.
- Nomura, N., Takahashi, M., Matsui, M., Ishii, S., Date, T., Sasamoto, S. and Ichizaki, R. (1988) Isolation of human cDNA clones of myb-related genes, A-Myb and B-myb. *Nucleic Acids Res*, **16**, 11075-11089
- Oelgeschläger, M., Janknecht, R., Krieg, J., Schreek, S. and Lüscher, B. (1996) Interaction of the co-activator CBP with Myb proteins: effects on Myb- specific transactivation and on the cooperativity with NF-M. *EMBO J.*, **15**, 2771-2780.
- Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Hojo, H., Yoshimura, S., Zhang, R., Aimoto, S., Ametani, Y., Hirata, Z. and Sarai, A. (1995) Comparison of the free and DNA-complexed forms of the DNA-binding domain from c-Myb. *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 309-320

- Ogata, K., Morikawa, S., Nakamura, H., Sekikawam A., Inoue, T., Kanai, H., Sarai, A., Ishii, S. and Nishimura, Y. (1994) Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices. *Cell*, **79**, 639-648
- Okazaki, N., Okazaki, K., Watanabe, Y., Kato-Hayashi, M., Yamamoto, M. and Okayama, H. (1998) Novel factor highly conserved among eukaryotes controls sexual development in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 887-895
- Pharmacia P-L Biochemicals Inc. (1993) GST Gene Fusion System
- Promega Corporation (1999) TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translation Systems. Technical Manual No. 045
- Promega Corporation (1997) Transcend[™] Non-Radioactive Translation Detection Systems. Part# TB182; Instruction for use of products L5061, L5070 ans L5080
- Ptashne, M. (1988) How eukaryotic transcriptional activators work. *nature*, **335**, 683-689.
- Qiagen (1999), Effectene[™] Transfection Reagent Handbook
- Qiagen (1998), Oligotex[™] Handbook, First Edition
- Qiagen (1999), Plamid Purification Handbook
- Qiagen (2001), ProofStart[™] PCR Handbook
- Qiagen (1997), QIAprep Miniprep Handbook
- Qiagen (1998), QIAquick Spin Handbook
- Qiagen (1999), *Taq* PCR Handbook
- Ramsay, R.G., Ishii, S. and Gonda, T.J. (1991) Increase in specific DNA binding by carboxyl truncation suggests a mechanism for activation of Myb. *Oncogene*, **6**, 1875-1879.
- Roussel, M., Saule, S., Lagrou, C., Rommens, C., Beug, H., Graf, T. und Stehelin, D. (1979) Three types of viral oncogenes of cellular origin specific for hematopoitic cell transformation. *nature*, **281**, 452-455
- Sakura, H., Kanei-Ishii, C., Nagase, T., Nakagoshi, H., Gonda, T.J. and Ishii, S. (1989) Delineation of three functional domains of the transcriptional activator encoded by the c-myb protooncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **86**, 5758-5762.

- Schmitt, K., Däubener, W., Bitter-Suermann, D. and Hadding, U. (1988) A safe and efficient method for elimination of cell culture mycoplasmas using ciprofloxacin. *Journal of Immunological Methods*, **109**, 17-25
- Scholz, M. (1999) Aufbau eines Zellkulturlabors und Etablierung eines Reportergenassays zur funktionellen Untersuchung des Transkriptionsfaktors c-myb und seiner Wechselwirkungspartner. *Diplomarbeit, Universität Hannover*
- Schürmann, A. (2000) Strukturelle und funktionelle Untersuchungen am Transkriptionsfaktor c-Myb und seinem Kofaktor Rcd1+. *Dissertation, Universität Hannover*
- Shivdasani, R.A. (2000) Molecular and Transcriptional Regulation of Megakaryocyte Differentiation. *Stem Cells*, **19**, 397-407
- Siegert, M. (1998) Untersuchung von Protein/Protein-Wechselwirkungen des Protoonkogens c-myb. *Diplomarbeit, Universität Hannover.*
- Sleeman, J.P. (1993) *Xenopus* A-myb is expressed during early spermatogenesis. *Oncogene*, **8**, 1931-1941
- Sokolowski, R.. (1998) Expression und Charakterisierung des c-Myb Protoonkogenproduktes. *Dissertation, Universität Hannover*
- Swope, D.L., Mueller, C.L., and Chrivia, J.C. (1996) CREB-binding protein activatestranscription through multiple domains. *J. Biol. Chem.*, **271**, 28138-28145.
- Takahashi, T., Suwabe, N., Dai, P., Yamamoto, M., Ishii, S. and Nakano, T. (2000) Inhibitory interaction of c-Mab and GATA-1 via transcriptional co-activator CBP. *Oncogene*, **19**, 134-140
- Tong, X., Drapkin, R., Yalamanchili, R., Mosialos, G. and Kieff, E. (1995) The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact withTFIIE. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 4733-4735.
- Tsang, A.P., Fujiwara, Y., Hom, D.B. and Orkin, S.H. (1998) Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes & Development*, **12**, 1176-1188
- Tsang, A.P., Visvader, J.E., Turner, C.A., Fujiwara, Y., Yu, C., Weiss, M.T., Crossley, M. and Orkin, S.H. (1997) FOG, a Multitype Zinc Finger Protein, Acts as a Cofactor for Transcription Factor GATA-1 in Erythroid and Megakaryocytic Differentiation. *Cell*, **90**, 109-119

- Vorbrueggen, G., Kalkbrenner, F., Guehmann, S. and Moelling, K. (1994) The carboxyterminus of human c-myb protein stimulates activated transcription in trans. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 2466-2475.
- Welter, C. Henn, W., Theisinger, B., Fischer, H., Zhang, K.D. und Blinn, N. (1990) the cellular myb oncogene amplified, rearranged and activated in human glioblastoma cell lines. *Cancer Lett.*, **52**, 57-62
- Westin, E., Gallo, R., Arya, S., Eva, A., Souza, L., Baluda, M., Aaronson, S. and Wong-Staal, F. (1982) Differential expression of the amv gene in human hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, **79**, 2194-2198
- Weston, K (1992) Extension of the DNA binding consensus of the chicken c-Myb and v-Myb proteins. *Nucleic Acids Res.*, **20**, 3043-3049
- Weston, K. and Bishop, J.M. (1989) Transcriptional activation by the v-myb oncogene and its cellular progenitor, c-myb. *Cell*, **58**, 85-93.

7. Anhang

Verwendete Primer

- Fog3neu : 5'-GCC GCG AAT TCG GTC CTG GTG GTG CGG CCC C-3';
 $T_M > 75\text{ °C}$
- Fog5neu : 5'-GCC GCG GAT CCT GCT TTG AGT GCG AGA TCA CC-3';
 $T_M = 74,6\text{ °C}$
- 5'-Fog : 5'-GCC GCG GAT CCA TGT CCA GGA GGA AAC AGA GC-3';
 $T_M = 74,6\text{ °C}$
- 3'-Fog: 5'-GCC GTC GAA TCC TCA CTT TAC GTG CTC GGC GG-3';
 $T_M = 73,3\text{ °C}$
- 5'-ZnFi6neu: 5'-CGC GGA TCC AAG ATG TCC GAG TTG GTG-3';
 $T_M = 69,5\text{ °C}$
- 3'-ZnFi6: 5'-CGC GAA TTC GTA CAG CTT GCG ACG CCG-3';
 $T_M = 71,0\text{ °C}$

Verwendete Oligonukleotide

- HATag-A 5'-GAT CGA TGT ATC CGT ATG ATG TGC CGG ATT ATG CCC-3'
- HATag-B 5'-GAT CGG GCA TAA TCC GGC ACA TCA TAC GGA TAC ATC-3'

Kathrin Ackermann
Sperlingsstieg 5
31139 Hildesheim
Tel. (05121) 22753

Zweitanschrift:
Sibeliusweg 4
30655 Hannover
Tel. (0511) 6909786

Lebenslauf

Name: Ackermann
Vorname: Kathrin
Geburtsdatum: 22. 11. 1967
Geburtsort: Hildesheim
Familienstand: ledig

Schulbildung: 1974 – 78 Grundschule Hildesheim-Neuhof
1978 – 87 Gymnasium Andreanum, Hildesheim

Studium: 1987 – 98 Universität Hannover
Studienfach: Chemie (Diplom)
Während des Hauptstudiums wiederholte mehrmonatige Tätigkeit bei Prof. Bölsing, Institut für Organische Chemie, Universität Hannover, Projekt Bodensanierung

Vordiplom: April 1991
Diplomprüfung: 20. – 24. 04. 1998
Diplomarbeit: 04. 05. – 23. 11 1998 am Institut für Technische Chemie, Universität Hannover, Arbeitsgruppe Prof. T. Scheper
Titel: Optimierungsstrategien zur Kultivierung mariner Mikroorganismen

Dissertation: 01. 03. 1999 – 28. 05 2002 Anfertigung der Dissertation am Institut für Biophysikalische Chemie, Medizinischen Hochschule Hannover, in der Arbeitsgruppe PD Dr. H. Wolfes

Tag der Promotion: 01. 07. 2002

Erklärung:

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe, sowie daß ich die zur Hilfeleistung herangezogenen Institutionen vollständig angeben habe.

Hannover, im Mai 2002

Kathrin Ackermann