

Kofaktoren von c-Myb

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

genehmigte Dissertation
von

**Dipl. Biochem. Martin Haas
geboren am 15.10.1974 in Hannover**

Hannover 2003

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biophysikalische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover in der Zeit vom 15.12.2000 bis zum 02.12.2003 unter der Leitung von Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. H. Wolfes angefertigt.

Referent:

Priv. Doz. Dr. 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: 02.12.2003

Erklärung:

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Jene Stellen, die ich anderen Untersuchungen und Arbeiten dem Wortlaut oder Sinn entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben gekennzeichnet.

Hannover, im Oktober 2003

Martin Haas

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich im Verlauf meiner Arbeit begleitet und unterstützt haben. Im Einzelnen bedanke ich mich bei...

Herrn Priv. Doz. Dr. Heiner Wolfes für die Möglichkeit, diese Promotion in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, für zahlreiche fachübergreifende Gespräche und die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit

Herrn Prof. Dr. W. Müller für die freundliche Übernahme des Korreferats

Frau Dr. E. Korenbaum für die Hilfe bei der Fluoreszenzmikroskopie

Claudia Thiel, Hella Scharnhorst und Christa Karre für ein entspanntes Arbeitsklima und technische Unterstützung

Andre Schürmann für die nette Einführung in Phage-Display und *Two-Hybrid*-Methoden

Marc Dangers, Michael Scholz und Manuel Taft für viele herausfordernde Duelle

Petra Vennekohl für die aufopfernde Geduld bei der Durchsicht der Arbeit

Allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen, die für ein nettes Arbeitsklima gesorgt haben und stets hilfsbereit zur Stelle waren, wenn es nötig war

Claudia für alles andere...

Meinen Eltern, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre

Publikationen

Wissenschaftliche Artikel

Schürmann, A., Sokolowski, R., Haas, M., Wolfes, H. (2001) Characterization of direct readout contacts of the Myb DNA binding domain. *Blood Cells, Molecules and Disease*.

Siegert, M., Haas, M., Wolfes, H. (2003) The c-Myb protein interacts with Rcd-1, a component of the CCR4 transcription mediator complex. *Biochemistry*, submitted.

Posterbeiträge

Haas, M., Siegert, M., Wolfes, H. (2001) Characterization and genomic organization of Rcd1, a murine CAF40 homologon which acts as a cofactor of the Myb proto-oncogene product.

Seventeenth Annual Meeting on Oncogenes, Frederick, Maryland

Haas, M., Siegert, M., Schürmann, A., Wolfes, H. (2001) The Myb protein interacts with Rcd1/CAF40, a component of the general transcriptional mediator CCR4.

Seventeenth Annual Meeting on Oncogenes, Frederick, Maryland

Haas, M., Siegert, M., Wolfes, H. (2001) Characterization and genomic organization of Rcd1, a murine CAF40 homologon which acts as a cofactor of the Myb proto-oncogene product.

Fall Meeting , Bochum

Haas, M., Siegert, M., Schürmann, A., Wolfes, H. (2001) The Myb protein interacts with CAF40, a component of the general transcriptional mediator CCR4.

Fall Meeting , Bochum

Haas, M., Wolfes, H. (2003) Rcd-1, A protein of the CCR4 transcription mediator complex is a cofactor of c-Myb. Nineteenth Annual Meeting on Oncogenes, Frederick, Maryland

Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Isolierung und Charakterisierung von bislang unbekanntem Kofaktoren des Transkriptionsfaktors c-Myb.

Zunächst wurde die Interaktion des möglichen Myb-Kofaktors Rcd-1 untersucht. Dabei konnte durch Kopräzipitation und im *Phage-Display* die Wechselwirkung der beiden Proteine bestätigt und die Expressionsmuster von c-Myb und Rcd-1 ermittelt werden. Anschließend wurde mittels Reporterassays gezeigt, dass Rcd-1 inhibitorische Wirkung auf die transaktivierenden Eigenschaften von c-Myb ausübt. Weiterhin konnte mit dem *Pathway Profiling*-System die Rolle von Rcd-1 in verschiedenen Transkriptionswegen eingegrenzt werden. Eine Beteiligung in der Erythropoetin-Signalkaskade konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Durch Sequenzvergleich wurde Rcd-1 als Faktor des Hefe-CCR4-Transkriptionsregulationskomplexes identifiziert. Ein Sequenzvergleich von Rcd-1 in verschiedenen Spezies ergab, dass das Protein evolutionär hochkonserviert ist.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurden mit Hilfe des *Two-Hybrid*-Systems weitere Kofaktoren von c-Myb identifiziert. Vier dieser Gene wurden in Expressionsvektoren kloniert und die Wechselwirkung der Proteine mit c-Myb wurde bestätigt. Weitere Experimente lieferten Hinweise, dass zwei der Proteine (Dlxin-1 und 5qNCA) mit c-Myb interagieren können.

Im dritten Abschnitt wurde die Rolle von c-Myb in den zellulären Signaltransduktionkaskaden untersucht. Mit dem *Pathway Profiling*-System wurde für c-Myb unter anderem eine Beteiligung an der AP-1 Signaltransduktionkaskade gefunden. Mit Reporterassays konnte E2F1 als starker Inhibitor des c-Myb abhängigen *mim-1* Promotors identifiziert werden.

Schlüsselwörter: c-Myb, Kofaktoren, Protein-Protein-Interaktion

Abstract

The aim of this thesis was the isolation and characterization of new co-factors of the transcription factor c-Myb. In the first part of the dissertation, the interaction between c-Myb and the putative co-factor Rcd-1 was studied. Co-precipitation and phage-display assays confirmed the interaction between the two proteins. Furthermore, the expression pattern of c-Myb and Rcd-1 was determined. Using reporter gene assays it was shown that Rcd-1 inhibits the transactivating properties of c-Myb. The role of Rcd-1 in different transcriptional pathways was assessed with the *Pathway Profiling*TM-system. Moreover, Rcd-1 is involved in the Erythropoietin signal cascade. Rcd-1 was identified as a factor of the yeast CCR4 transcription mediator complex by data base mining. A sequence comparison of Rcd-1 proteins from different species revealed that the protein is evolutionary conserved.

In the second chapter of the thesis more putative c-Myb co-factors were identified with the *Two-Hybrid* system. Four of these genes were cloned into expression vectors and the interaction with c-Myb was verified. Further experiments provided evidence that two of these proteins (Dixin-1 and 5qNCA) may interact with c-Myb.

In the third part of the thesis, the role of c-Myb in cellular signal transduction cascades was studied. The *Pathway Profiling*TM-system was used to confirm the participation of c-Myb in the AP-1 signal cascade. E2F1 was identified as a strong inhibitor of the c-Myb dependant *mim-1* promoter.

Keywords: c-Myb, co-factors, protein-protein-interaction

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Signaltransduktion	1
1.2	Die Myb-Familie	2
1.2.1	Der Transkriptionsfaktor c-Myb	3
1.2.2	Die Struktur von c-Myb	5
1.2.2.1	DNA-Bindungsdomäne	5
1.2.2.2	Transaktivierende Domäne.....	7
1.2.2.3	Negativ regulatorische Domäne	7
1.2.3	Regulation von c-Myb.....	8
1.3	c-Myb und seine Kofaktoren	10
1.3.1	Rcd-1.....	10
1.3.1.1	Besonderheiten von Rcd-1	13
1.3.1.2	CpG-Inseln	13
1.3.2	Weitere Kofaktoren von c-Myb	14
1.3.3	c-Myb und die Differenzierung	18
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	21
2.1.1	Verwendete Bakterienstämme	21
2.1.2	Verwendete bakterielle Vektoren.....	23
2.1.3	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	24
2.1.4	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	25
2.1.5	Expression von Proteinen	27
2.1.5.1	Expressionstest	27
2.1.5.2	Durchführung der Proteinexpression	28
2.1.5.3	Fermentation	28
2.2	Arbeiten mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.2.1	<i>Two-Hybrid</i> -System	29
2.2.1.1	Verwendeter Hefestamm	30
2.2.2	Lagerung von Hefe-Zellen	30
2.2.3	Kultivierung	31
2.2.4	Transformation von Hefen	32
2.2.5	Isolierung von Plasmid DNA aus <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	34
2.2.6	β -Galaktosidase- <i>colony-lift</i> -Filter-assay	35
2.3	Arbeiten mit eukaryontischen Zellen	36
2.3.1	Medien für die Zellkultur	36
2.3.2	Arbeiten in der Zellkultur	37
2.3.2.1	Passagieren von Zellen	38
2.3.2.2	Lagerung von eukaryontischen Zellen.....	39
2.3.2.3	Ermittlung der Zellzahl mit dem Hämocytometer.....	40
2.3.3	Transiente Transfektionen.....	41
2.3.3.1	Kalziumphosphat-Methode	41
2.3.3.2	Effectene/Superfect	42
2.3.3.3	Elektroporation	43
2.3.4	Ernten von Zellen	44
2.3.4.1	Ernten für β -Galaktosidase- und Luziferase-Assay	44
2.3.4.2	Ernten für Proteinaufarbeitung/Zellkernextraktion	45
2.3.5	Reportergen-Assays.....	45
2.3.5.1	β -Galaktosidase-Assay.....	45
2.3.5.2	Luziferase-Assay	46

2.3.6	GFP-Quantifizierung.....	47
2.3.7	Fluoreszenzmikroskopie.....	47
2.3.8	Verwendete Plasmide in der Zellkultur	49
2.3.9	Verwendete Zelllinien	52
2.4	Arbeiten im Rahmen des <i>Phage-Display-Systems</i>.....	54
2.4.1	Vermehrung von M13KO7-Helferphagen	56
2.4.2	Isolierung der Phagen	56
2.4.3	Vermehrung der rekombinanten Phagen	57
2.4.4	Beschichtung der Mikrotiterplatten	57
2.4.5	Das Panning.....	57
2.5	Molekularbiologische Methoden.....	59
2.5.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	59
2.5.2	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	62
2.5.2.1	Konzentrationsbestimmung mittels Agarose Gel-Elektrophorese	62
2.5.2.2	Konzentrationsbestimmung mittels UV-Spektrum	62
2.5.3	Präparation von RNA und mRNA aus eukaryontischen Zellen	62
2.5.4	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	62
2.5.5	DNA-Modifikationen	63
2.5.5.1	Restriktionsspaltung von DNA.....	63
2.5.5.2	Ligation von DNA.....	63
2.5.5.3	Dephosphorylierung von DNA	64
2.5.5.4	Phosphorylierung von DNA	64
2.5.6	PCR.....	64
2.5.6.1	RT-PCR	66
2.5.6.2	Verwendete PCR-primer.....	67
2.5.7	Aufreinigung von PCR-Produkten	67
2.5.8	Gel-Elektrophorese	68
2.5.8.1	Agarosegel-Elektrophorese	68
2.5.8.2	Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAAGE)	69
2.5.8.3	Längenmarker für Gel-Elektrophoresen	69
2.5.8.4	SDS-PAAGE nach Laemmli	70
2.5.8.5	Marker für Laemmli-gel	71
2.6	Proteinbiochemische Arbeiten.....	72
2.6.1	Proteinaufreinigung	72
2.6.1.1	Aufreinigung von (His) ₆ -tag-Proteinen	72
2.6.1.2	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	72
2.6.1.3	Aufreinigung von Proteinen mit FC-tag.....	73
2.6.2	Trichloressigsäure (TCA)-Fällung.....	74
2.6.3	DNA-Zellulose-Bindungs-Assay	74
2.6.4	Präparation von Zellkernextrakten.....	75
2.6.5	Immunopräzipitation mit CNBr-aktivierter Sepharose.....	76
2.6.6	<i>Western-blot</i>	77
2.6.6.1	Verwendete Antikörper	78
2.6.7	<i>Northern-blot</i>	79
2.6.8	Proteinfärbung.....	80
2.6.8.1	Proteinbestimmung nach Bradford	80
2.6.8.2	Coomassie-Färbung	81
2.6.8.3	Silberfärbung	81
2.6.8.4	<i>Stains-All</i>	82
2.6.9	Verwendete Computerprogramme	83
2.6.9.1	MultiAlign	83
2.6.9.2	WinEasy	83
2.6.9.3	DNAMend	83

2.6.9.4	Chromas	83
3	DURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE	84
3.1	Untersuchungen des Kofaktors Rcd-1	84
3.1.1	Expression von Rcd-1 in <i>E. coli</i>	84
3.1.2	<i>Pull-Down-Assay</i> von Rcd-1 und der C-terminalen Domäne von c-Myb	85
3.1.3	Kopräzipitation von Rcd-1 mit c-Myb.....	87
3.1.4	Nachweis von Wechselwirkungen mit dem <i>Phage-Display-System</i>	88
3.1.5	Ermittlung des Expressionsmusters von Rcd-1 mittels RT-PCR.....	90
3.1.6	Reportergenassays mit c-Myb und Rcd-1	93
3.1.6.1	Dosisabhängige Wirkung von Rcd-1 auf den <i>mim-1</i> Promotor.....	93
3.1.7	Rcd-1 im <i>Mercury-Pathway Profiling-System</i>	95
3.1.8	Bindung von Rcd-1 an DNA-Zellulose.....	96
3.1.9	Fluoreszenzmikroskopie von RFP markiertem CCR4	97
3.2	Weitere Kofaktoren	98
3.2.1	Ablauf des <i>Two-Hybrid-Screenings</i>	98
3.2.2	Transformation des Köderkonstruktes in Y190	99
3.2.3	Untersuchungen von Sexcomb on midleg.....	100
3.2.4	Untersuchung von Dlxin-1	102
3.2.5	Untersuchungen mit der Tyrosinphosphatase.....	104
3.2.6	Untersuchungen mit 5qNCA.....	105
3.2.7	Weitere <i>Yeast-Two-Hybrid</i> Kofaktoren	109
3.3	Untersuchungen an und mit c-Myb	109
3.3.1	<i>Mercury-Pathway-System</i>	109
3.3.2	Test von verschiedenen Transkriptionsfaktoren auf c-Myb Interaktion.....	110
3.3.3	Kopräzipitation mit E2F1 und c-Myb.....	112
4	DISKUSSION	113
4.1	Versuche mit dem c-Myb Kofaktor Rcd-1	113
4.2	<i>Mercury-Pathway-System</i> mit c-Myb.....	118
4.3	Interaktion von c-Myb mit E2F1.....	119
4.4	Neue putative Kofaktoren von c-Myb.....	121
5	LITERATURVERZEICHNIS	123

Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Amoni-1,2,4-triazol
A	Ampere
AAP	Azorubinauftragspuffer
Ac	Acetat
AD	Aktivierungsdomäne
ad	auffüllen auf
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
A _x	Absorption bei x nm
BD	Bindungsdomäne
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CBP	CREB <i>binding protein</i>
CD	Circulardichroismus
cfu	Kolonie bildende Einheiten (<i>colony forming units</i>)
CIAP	alkalische Phosphatase (<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i>)
CMV	<i>cytomegalovirus</i>
CREB	<i>c-AMP response element binding protein</i>
d	desoxy
DBD	DNA-Bindungsdomäne
dd	didesoxy
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
ds	doppelsträngig
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Dinatriummethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
EPO	Erythropoetin
<i>EST</i>	<i>Expressed sequence tags</i>
EtBR	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
(His) ₆ -tag	His-Hexapeptid
HTH	<i>Helix-Turn-Helix</i>
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktosid
Jak	Janus-Kinasen
K	Kilo-

Kan	Kanamycin
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAP	Laemmliauftragspuffer
LB	Luria-Bertani
Lsg.	Lösung
M	Molar
MCS	<i>Multiple cloning cite</i>
MeSH	β -Mercaptoethanol
min	Minute(n)
mind.	mindestens
ml	Milliliter
μ	mikro-
n	nano-
NRD	Negativ regulatorische Domäne
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid
PAAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
<i>pfu</i>	<i>plaque forming unit</i>
RFP	<i>Red fluorescent protein</i>
RLM-RACE	<i>RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' and 3' ends</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRB	<i>suppressors of RNAPolymeraseB</i>
TAD	Transaktivierende Domäne
TAF	<i>transcription accessory factor</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRF1/TRF2	Telomer Bindungsproteine
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TTF	<i>Telomer binding proteins</i>
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
W	Watt
w/v	Gewichtsprozent
X	beliebige Aminosäure
ZKBS	Zentrale Kommission für die biologische Sicherheit

Aminosäuren werden nach dem internationalen Ein- oder Dreibuchstabencode abgekürzt.

Die Abkürzung der Basen entspricht den *IUB tentative rules*.

1 Einleitung

1.1 Signaltransduktion

Für jede lebende Zelle ist die Fähigkeit, Signale von außen zu erkennen und zu verarbeiten, für ihr Überleben von entscheidender Bedeutung. Die Zelle muss in der Lage sein, auf veränderte Bedingungen und Anforderungen im Laufe ihrer Existenz zu reagieren. Dieser Vorgang, bei dem extrazelluläre Signale erkannt und in intrazelluläre Veränderungen umgewandelt werden, wird als Signaltransduktion bezeichnet. Die Kaskaden der beteiligten Proteine werden Signalkaskaden genannt. Besonders komplex sind sie bei mehrzelligen Organismen, bei denen Ereignisse wie die Differenzierung von Zellen, Zellteilungen oder apoptotische Prozesse in unterschiedlichen Zelltypen reguliert werden müssen.

Um ein von außen kommendes Signal zu erkennen, wird ein Rezeptor benötigt. Dieser leitet das Signal in das Innere der Zelle weiter. Hier läuft das Signal über Enzymkaskaden weiter in den Zellkern. Diese können eine erhebliche Verstärkung des ursprünglichen Signals zur Folge haben. An ihrem Ende steht häufig die Phosphorylierung eines Zielmoleküls, das hierdurch eine Aktivitätsänderung erfährt. Meist handelt es sich bei diesen Zielmolekülen um Transkriptionsfaktoren, die zur Regulation der Transkription in der Lage sind.

In den letzten Jahren hat sich das Verständnis der Signaltransduktion stark verbessert. Besonders durch die Entdeckung der Onkogene können die Transduktionsprozesse der Zellen heute deutlich besser erklärt werden. Grundlegend war dabei die Entdeckung der viralen Onkogene (*v-onc*). Diese wurden in tumorverursachenden Retroviren durch Hybridisierungsversuche von viraler RNA mit Geflügel-DNA entdeckt. Dabei zeigte sich, dass zu jedem viralen Onkogen ein Proto-Onkogen (*c-onc*) existiert. Die Proto-Onkogene liegen in der gesunden Zelle vor und ihre Genprodukte erfüllen häufig Aufgaben bei Wachstums- oder Differenzierungsprozessen. Meist weisen die viralen Formen der Proto-Onkogene Deletionen und Mutationen auf, die zu fehlerhafter Funktion und schließlich zur Tumorbildung führen können (Stehelin *et al.*, 1976). Auch die Entartung von Proto-Onkogenen durch Deletionen oder Leserasterverschiebung zu Onkogenen kann Krebs auslösen. An einer Tumorbildung sind meist mehrere Veränderungen an Proto-Onkogenen beteiligt.

Die Onkogene lassen sich je nach Funktion in verschiedene Klassen einteilen:

- Wachstumsfaktoren (Übergang der Zelle aus der G₀ bzw. G₁-Phase in den Zellzyklus)
- Membran-Rezeptoren (binden Wachstumsfaktoren)
- Guaninnukleotid-bindende Proteine
- Proteinkinasen (Übertragung von Signalen zur Wachstumskontrolle)
- Kernproteine (Transkriptionsfaktoren)

1.2 Die Myb-Familie

v-Myb ist ein virales Onkogen, das als ein Bestandteil des AMV (*avian myeloblastosis virus*) (Hall *et al.*, 1941; Roussel *et al.*, 1979) und des E26-Virus identifiziert wurde (Ivanov *et al.*, 1962; Klempnauer *et al.*, 1984). Das Akronym Myb leitet sich aus dem Begriff Myeloblastose ab. Die Myeloblastose bezeichnet dabei eine Leukämie mit einem Überschuss an Myeloblasten im Blut (Psyrembel, 1998).

v-Myb ist das virale Homologon einer Proteinfamilie, zu der neben v-Myb noch die Homologen A-Myb, B-Myb (Nomura *et al.*, 1988) und c-Myb gehören. Ferner sind die Telomer Bindungsproteine TRF1/TRF2 (Broccoli *et al.*, 1997), der Transkriptionsterminationsfaktor TTF-1 (Evers *et al.*, 1995) und das *circadian clock associated* 1-Genprodukt (CCA-1), das für die Kontrolle des 24-Stunden Rhythmus zuständig ist (Sugano *et al.*, 1998), Mitglieder dieser Familie. Allen Proteinen dieser Gruppe ist eine identisch aufgebaute DNA-Bindungsdomäne gemeinsam (Lam *et al.*, 1992; Mettus *et al.*, 1994). Die viralen Proteine unterscheiden sich dabei von den zellulären Proteinen durch mehrere Punktmutationen und Deletionen am N- und C-Terminus.

Die DNA-Bindungsdomäne besteht aus zwei bis drei sich wiederholenden hochkonservierten Sequenzen, die als *repeats* bezeichnet werden. In jedem *repeat* sind Tryptophane mit einem konservierten Abstand von 18 beziehungsweise 19 Aminosäuren zu finden.

Als Kriterium für die Familienzugehörigkeit gilt die folgende Konsensussequenz der *repeats*:

W-[ST]-(X)₂-E-[DE]-X₂-[LIV] [Swiss-Protein-Bank *prosite*]

Eckige Klammern bezeichnen alternative Aminosäuren

Indizes geben die Anzahl der beliebigen Aminosäure X an.

1.2.1 Der Transkriptionsfaktor c-Myb

Myb-Proteine treten in zahlreichen Spezies auf und sie sind hoch konserviert. So findet man c-Myb nicht nur beim Menschen (Majello *et al.*, 1986), sondern auch in anderen Säugern, wie beispielsweise in der Maus (Gonda *et al.*, 1985), im Huhn (Gerondakis *et al.*, 1986), in Mais (Marocco *et al.*, 1989), in Amphibien (Lipsick *et al.*, 2001) und in der Hefe (Tice-Baldwin *et al.*, 1989). Ebenso sind A-Myb und B-Myb über die Speziesgrenzen hinweg hochkonserviert (Leech *et al.*, 1993; Ju *et al.*, 1990; Ohi *et al.*, 1998) (siehe Abbildung 1).

Die Funktion der Myb-Proteine in der Säugetierzelle ist noch nicht ausreichend aufgeklärt. Allen Myb-Proteinen gemeinsam ist die Fähigkeit DNA zu binden. A-, B- und c-Myb spielen in der Zelle bei Proliferations- und Differenzierungsvorgängen eine wichtige Rolle (Ness, 1996). Obwohl in Hybridisierungsassays nachgewiesen wurde, dass die drei Proteine jeweils die gleiche DNA Sequenz erkennen können (Klempnauer *et al.*, 1989; Weston, 1990) und vermutet wurde, dass sie sich gegenseitig ersetzen könnten, besitzt offenbar jedes der drei Myb-Proteine eine eigene Gruppe von Genen, die von ihm spezifisch reguliert werden (Rushton *et al.*, 2001; Rushton *et al.*, 2003). So induziert zum Beispiel nur c-Myb die Enzyme Keratin 16 und Tubulin β 4, die für Zellproliferation essentiell sind (Paramio *et al.*, 1999; Shan *et al.*, 1999). Dies ist ein weiteres Indiz für die Rolle von c-Myb bei Differenzierungs- und Wachstumsprozessen. Trotz der hohen strukturellen Verwandtschaft der Proteine existieren also wesentliche Unterschiede in der regulatorischen Funktion.

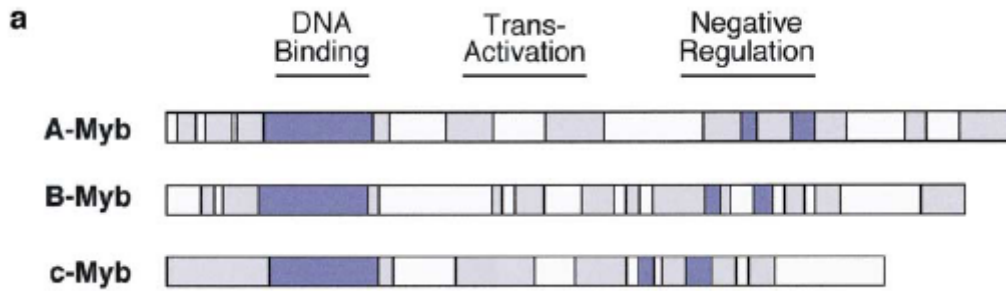


Abbildung 1: Vergleich der Struktur von A-, B- und c-Myb (Rushton *et al.*, 2003)

Das Proto-Onkogen c-Myb fungiert in der Zelle als Transkriptionsfaktor (Chen *et al.*, 1993) und ist kernständig lokalisiert (Bading *et al.*, 1988). Seine Rolle als Transkriptionsfaktor bei Differenzierungs- und Proliferationsprozessen ist bis heute nur ungenügend aufgeklärt. Allerdings wurde nachgewiesen, dass eine Deletion des Gens letal ist. Transgene Mäuse ohne funktionsfähiges c-Myb sterben um den 15. Tag der Gestation. Die Embryonen weisen dabei Defekte hepatischer Zellen und eine gestörte Hämatopoese auf (Mucenski *et al.*, 1991). Sowohl die Erythro- als auch die Myelopoese weisen dabei Störungen auf, wohingegen die Megakaryozyten normal gebildet werden können (Lin *et al.*, 1996). Diese Ergebnisse weisen dem Protein eine entscheidende Rolle bei der Blutbildung zu (Calabretta *et al.*, 1993).

Allgemein versteht man unter Transkriptionsfaktoren Proteine, die am Ende einer Signalkaskade stehen und die Transkription im Zellkern regulieren können. Sie können entweder direkt an die Promotorbereiche der DNA binden und ihre Transkription beeinflussen oder als Brückenfaktor (Adapterproteine) dienen und somit Wechselwirkungen zwischen anderen Proteinen ermöglichen (Ogata *et al.*, 1994). Wird durch diese Bindung die Transkription blockiert, spricht man von Repressoren, wird sie dagegen aktiviert, von Induktoren. Die Transkriptionsfaktoren selbst können dabei durch andere Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Dies kann durch Phosphorylierungen der Proteine, oder auch durch selektive Transkription/Translation der Faktoren erfolgen (Tanikawa *et al.*, 1993). Störungen dieser Kaskaden können zu Krebs führen. Eines dieser Proto-Onkogene ist c-Myb (Brown *et al.*, 1992; Calabretta *et al.*, 1992). Proto-Onkogene können prinzipiell alle Proteine sein, die an Signalkaskaden beteiligt sind. Durch Mutationen in diesen Genen können aus ihnen tumorgenerierende Onkogene entstehen.

Bisher am besten untersucht ist die Rolle von c-Myb bei der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen (Rosson *et al.*, 1986; Bloch *et al.*, 1995). Aber auch bei der

Zellzykluskontrolle spielt c-Myb eine wichtige Rolle. In Vertebraten regelt es den Übergang der G₁- in die S-Phase (Okada *et al.*, 2002; Katzen *et al.*, 1998). Veränderung des Onkogens können zu Leukämien (Ramsay *et al.*, 2003) oder Brustkrebs führen (Wolff, 1996).

Die Expression von c-Myb findet in zahlreichen Geweben statt (Westin *et al.*, 1982), vor allem aber in Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems (Busch *et al.*, 1983). Hierbei hat sich gezeigt, dass eine Deletion von c-Myb zum Versagen der adulten Hämatopoese führt (Mucenski *et al.*, 1991).

1.2.2 Die Struktur von c-Myb

1.2.2.1 DNA-Bindungsdomäne

Die DNA-Bindungsdomäne umfasst 155 Aminosäuren nahe dem N-Terminus an der AS-Position 38-193. Sie ist in drei homologe Bereiche R1-R3 gegliedert (vergleiche Abbildung 2), die jeweils aus 51 oder 52 Aminosäuren bestehen. Jeder dieser Bereiche enthält in einem Abstand von 18 oder 19 Aminosäuren ein hoch konserviertes Muster aus drei Tryptophanresten (Ogata *et al.*, 1992). Jeder dieser drei *repeats* ist in einer eigenen Familie zugeordnet, wobei sich die *repeats* der einzelnen Familien untereinander sogar ähnlicher sind, als die *repeats* in demselben Protein (Frampton *et al.*, 1989).

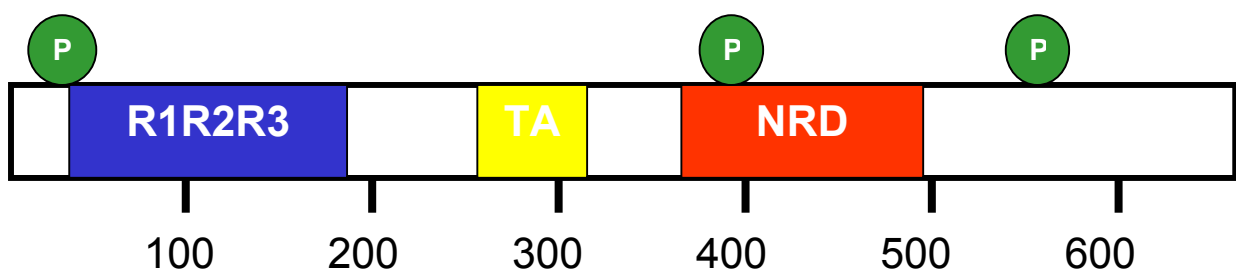


Abbildung 2: Modell der Struktur vom c-Myb. Dargestellt sind die *repeats* 1 bis 3 der DNA-Bindungsdomäne (R1-R3), die Transaktivierende Domäne (TA) und die negativ regulatorische Domäne (NR)

Die Region R2 und R3 zeichnen sich durch einen hohen Anteil (23%) an basischen Aminosäuren aus. Die Bereiche R1 und R3 bestehen aus drei α -Helices mit zwei *Helix-Turn-Helix* Motiven. Der Bereich R2 enthält nach NMR-Strukturuntersuchungen vermutlich ebenfalls 3 α -Helices (Lipsick, 1996). Ältere Untersuchungen (Ogata *et al.*, 1993), nach denen der Bereich der dritten Helix in R2 zunächst unstrukturiert vorliegt und sich erst nach der Bindung an die DNA zur Helix faltet, wurden durch neuere NMR Daten nicht unterstützt (Ebneith *et al.*, 1994). Hier bedarf es zur endgültigen Aufklärung weiterer Experimente. Die spezifische Sequenzerkennung erfolgt durch die jeweils dritte Helix der Region 2 und 3. Der Bereich R1 dient wahrscheinlich nur einer verbesserten DNA-Protein-Wechselwirkung (Ebneith *et al.*, 1994). Verlust dieser Region führt zu einer fünf- bis zehnfachen Verschlechterung der DNA-Bindung (Dini *et al.*, 1993), obwohl in den NMR-Daten keine direkten Kontakte dieser Region zu der DNA oder den *repeats* 2 und 3 gezeigt werden konnten (Ogata *et al.*, 1994).

Die Bindung von c-Myb an DNA führt zu einer wesentlichen Änderung der Sekundärstruktur (*bending*) in den Bereichen R2 und R3. Dort konnte eine 10%ige Veränderung der Konformation beobachtet werden, die vermutlich auf eine Neuorientierung der Indolringe der Tryptophane zurückzuführen sind (Ebneith *et al.*, 1994; Saikumar *et al.*, 1994).

An der Erkennung der DNA durch c-Myb sind noch weitere zum Teil wenig charakterisierte Kofaktoren beteiligt, die die Spezifität der Erkennung erhöhen. DNA-Sequenzen, die von c-Myb erkannt und gebunden werden, sind zum Beispiel:

- Mim-1 Promotor (Ness *et al.*, 1989)
- Tom-1 Promotor (Burk *et al.*, 1993)
- Neutrophile-Elastase Promotor (Oelgeschläger *et al.*, 1996)
- Hühner Adenosin Rezeptor 2B Promotor (Braas *et al.*, 2003)
- Kollagen alpha 2 Promotor (Typ I) (Luchetti *et al.*, 2003)
- Als Konsensus wurde dabei das *myb responsive element* (MRE) identifiziert, (C/T)AAC(G/T)G (Biedenkapp *et al.*, 1988)

Bei beiden Formen des v-Myb-Onkogenproduktes liegt jeweils eine Deletion am N- und C-Terminus vor. Der hierdurch verursachte Verlust des R1 führt vermutlich zu einer verringerten Spezifität der DNA-Bindungsdomäne. Die Regulation der von c-Myb kontrollierten Gene wird dadurch vermutlich verändert, Krebsentstehung wird begünstigt.

1.2.2.2 Transaktivierende Domäne

Die transaktivierende Domäne von c-Myb liegt zwischen den AS 275 bis 325. Sie besitzt ausgeprägte hydrophile Eigenschaften und einen leicht aziden Charakter (Kanei-Ishii *et al.*, 1992). Gefunden wurde sie durch Aktivierungsstudien eines Fusionsproteins der DNA Bindungsdomäne von Gal4 und verschiedenen Fragmenten des c-Myb Proteins um die transaktivierende Domäne (Lane *et al.*, 1990). Eine vollständige Inaktivierung der transaktivierenden Eigenschaften ist nach Deletion von 11 Aminosäuren in der Region zu beobachten (Weston *et al.*, 1989). An der Transaktivierung ist offenbar ein auf zehn Aminosäuren eingegrenzter Bereich, mit den Aminosäuren EFATLQF(I/L)D, das so genannte FAETL-Motiv (AS 392-396), beteiligt (Fu *et al.*, 1996).

1.2.2.3 Negativ regulatorische Domäne

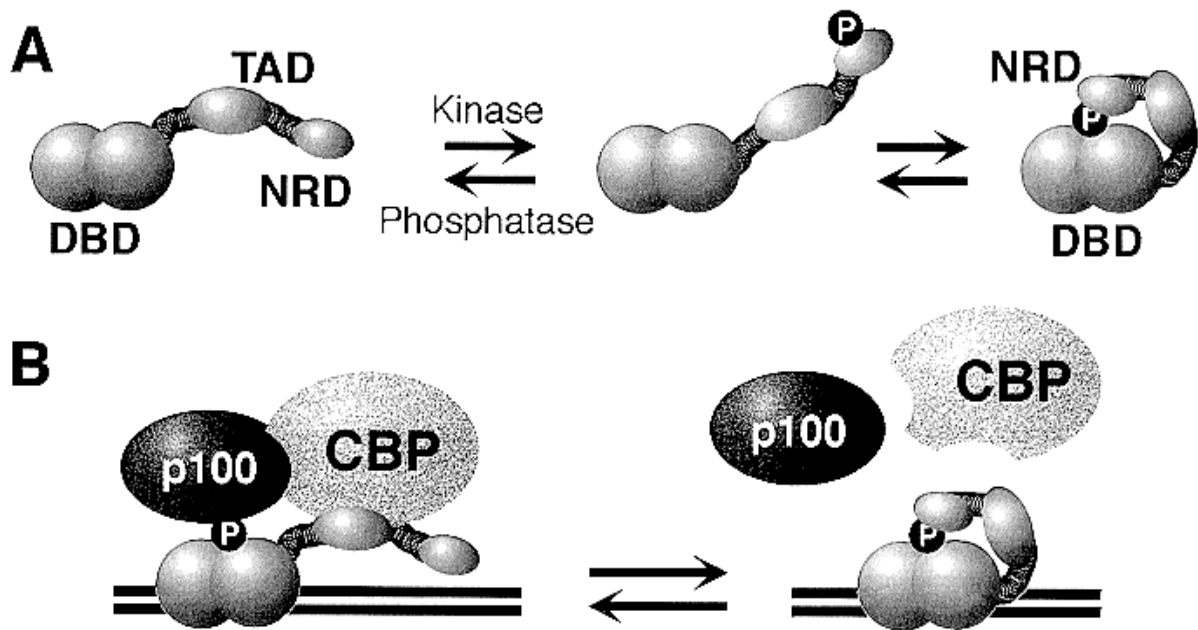
Die Negativ regulatorische Domäne (NRD) umfasst den Bereich zwischen den Aminosäuren 350-500. Durch sie wird die Transaktivierung (Sakura *et al.*, 1989) und die Transformation inhibiert (Kanei-Ishii *et al.*, 1992). Außerdem scheint sie die DNA-Bindung von c-Myb zu regulieren (Ramsay *et al.*, 1991). Eine Deletion dieses Bereiches von c-Myb führt zu einem deutlichen Anstieg der Transaktivierung (Hu *et al.*, 1991) (vgl. auch nächster Abschnitt). Im Bereich der negativ regulatorischen Domäne liegt auch das EVES-Motiv. Dieses Motiv ist in den c-Myb Proteinen der Vertebraten hochkonserviert und enthält eine Phosphorylierungsstelle, die an der negativen Regulation beteiligt ist. Für das EVES-Motiv konnte eine Wechselwirkung mit p100 nachgewiesen werden (Dash *et al.*, 1996). Ebenfalls im Bereich der negativ regulatorischen Domäne befindet sich das PEST-Motiv, das sich durch eine Häufung der Aminosäuren Prolin (P), Glutamin (E), Serin (S) und Threonin (T) auszeichnet.

Das PEST-Motiv gilt als Signal für einen schnellen proteolytischen Abbau (Rogers *et al.*, 1986 [Rechsteiner, 1996 #58]), hat also vermutlich einen wichtigen Anteil an der Regulation von c-Myb.

1.2.3 Regulation von c-Myb

Regulation der Aktivität von c-Myb kann unter anderem durch Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten erfolgen, nicht aber an den Tyrosinresten. Am N-Terminus liegen Bindungsstellen für die Casein-Kinase-II (CKII), die eine Phosphorylierung an Position Ser-11 oder Ser-12 ermöglichen. Die Phosphorylierung an diesen Positionen hat *in vitro* eine verringerte Affinität der DNA-Bindungsdomäne (DBD) zu ihren Erkennungssequenzen zur Folge (Lüscher *et al.*, 1990).

Weitere Phosphorylierungsstellen befinden sich im Bereich der NRD. Hier sind Phosphorylierungsstellen für die zellzyklusspezifische p34^{cdc2}-Kinase zu finden (Pines *et al.*, 1990). Es konnte gezeigt werden, dass Myb-Proteine während der Mitose zellzyklusspezifisch hyperphosphoryliert werden (Lüscher *et al.*, 1992). Im Bereich der so genannten EVES-Domäne konnte *in vitro* an der Position Ser-528 (Maus-Myb) außerdem eine Phosphorylierungsstelle für die p42^{mapk}-Kinase identifiziert werden (Aziz *et al.*, 1993). Durch Mutation von Ser-528 mit Alanin verliert c-Myb seine transformierenden Eigenschaften, seine Transaktivierungsaktivität am *myb responsive element* (MRE) wird jedoch erhöht. Diese Daten deuten auf eine Unterdrückung der transaktivierenden Eigenschaften des c-Myb Proteins durch Phosphorylierung an Ser-528 hin (Aziz *et al.*, 1995). Ein möglicher Mechanismus für diese Inhibition ist in Abbildung 3 dargestellt. Hierbei führt die Rückfaltung der NRD zu einem verschlechterten Zugang der DBD an die DNA. In Abbildung 3 B ist zu erkennen, dass diese Rückfaltung sich auch auf die Zugänglichkeit für Kofaktoren von c-Myb auswirken könnte.



Abbildungung 3: **Mechanismus der Regulation in der NRD (Ness, 1996)**

A: Durch Phosphorylierung im EVES-Motiv kann die Transkriptionsaktivität inhibiert werden.

B: Die Rückfaltung stört die Zugänglichkeit für weitere Kofaktoren.

Wie die Regulation von c-Myb *in vivo* abläuft ist jedoch größtenteils noch unklar und auch in der Literatur finden sich teilweise widersprüchliche Aussagen. So wird durch die Phosphorylierung an der Position Ser-11 oder Ser-12 von einigen Autoren eine Verbesserung der DNA-Bindung beschrieben (Ramsay *et al.*, 1995).

Eine weitere Möglichkeit, die Aktivität des c-Myb Proteins zu regulieren ist die Sumoylierung. Sumo ist ein dem Ubiquitin verwandtes kleines Protein, das an größeren Proteinen zur Modifikation benutzt werden kann (Saitoh *et al.*, 1997). Sumoylierung wurde an den Positionen Lys-499 und Lys-523 nachgewiesen. Seine Aufgabe liegt vermutlich in der negativen Regulation der Transkriptionsaktivität (Verger *et al.*, 2003). Die Mutation an der Position 523 (K523R), also im Bereich des PEST/EVES-Motivs, führt zum völligen Verlust der Fähigkeit von c-Myb Sumo-1 zu binden (Bies *et al.*, 2002).

Bei der Regulation von Genen durch c-Myb werden bei der Transkriptionsaktivierung weitere Proteine benötigt. Ein Beispiel für einen solchen Kofaktor ist NF-M, ein Protein, das in unvollständig differenzierten Granulozyten zu finden ist. Dabei ist

weder c-Myb noch NF-M gewebespezifisch (Katz *et al.*, 1993). Zusammen bilden sie einen Komplex, der in myeloiden Zellen den *mim-1* Promotor reguliert (Ness *et al.*, 1994).

Ein weiteres Beispiel eines solchen Zusammenspiels von Proteinen, die nur gemeinsam ihre Spezifität entfalten, ist bei der T-Zell Entwicklung zu finden. Hier bindet c-Myb gemeinsam mit „*core binding factors*“ an einen Promotor in der δ -Region des humanen T-Zell Rezeptors und reguliert die Genexpression während der T-Zell Entwicklung (Hernandez-Munain *et al.*, 1994).

Diese und weitere Beispiele verdeutlichen, dass bei der Betrachtung von Myb-Zielgenen, immer auch mögliche Kofaktoren in die Modelle einbezogen werden müssen.

1.3 c-Myb und seine Kofaktoren

1.3.1 Rcd-1

Bei dem Transkriptionsfaktor Rcd-1 handelt es sich um ein Protein, das bisher vor allem in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* untersucht wurde. In Vertebraten wurde ein kürzeres homologes von Rcd-1 mit 299 Aminosäuren gefunden. Rcd-1 spielt eine essentielle Rolle bei der sexuellen Entwicklung der Spaltheife (*rcd* = *required for cell differentiation*). Im Experiment waren *rcd-1*-Deletionsmutanten steril, wenn sie durch Stickstoffmangel zur sexuellen Entwicklung angeregt wurden. Eine Induktion durch Glukose ist jedoch möglich (Okazaki *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse weisen Rcd-1 einen möglichen Platz im Ste11-Signalweg zu (Egel *et al.*, 1990), der nicht nur die sexuelle Entwicklung, sondern auch die Meiose in der Spaltheife steuert (Yamamoto, 1996) (siehe Abbildung 4).

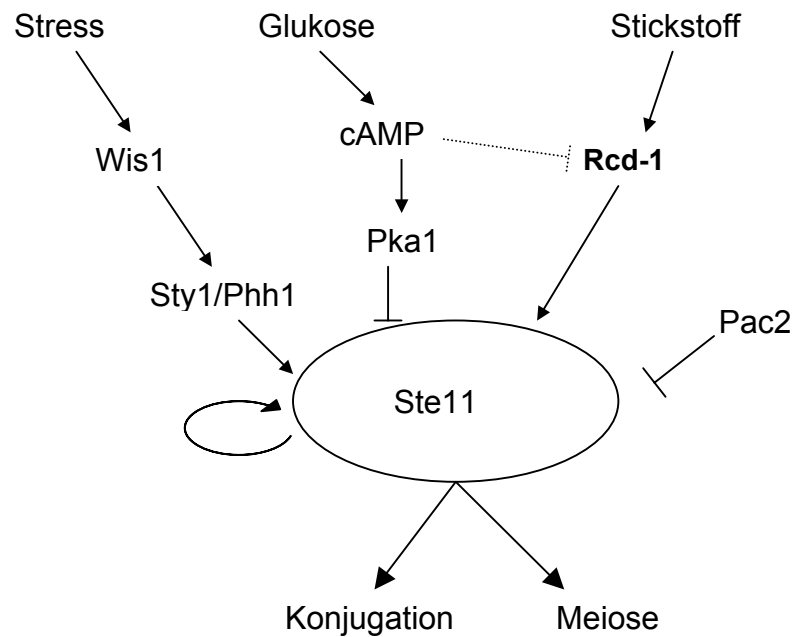


Abbildung 4: Ste11-Signalweg mit möglicher Position für Rcd-1. Modifiziert nach (Okazaki *et al.*, 1998)

Das *Rcd-1*-Gen ist hochkonserviert in zahlreichen Spezies, von der Hefe, über Pflanzen bis hin zum hoch entwickelten Säuger. Wie in Abbildung 5 zu erkennen ist, liegt die Homologie bei vielen Spezies über 90%. Das Protein hat ein Molekulargewicht von 33 kDa. Strukturuntersuchungen mittels Circular dichroismus ergaben für das Protein einen α -Helix-Anteil von ungefähr 48% (Schürmann, 2000). Mittels analytischer Ultrazentrifugation wurde ermittelt, das Rcd-1 als Monomer vorliegt. *Northern-dot-blot* Untersuchungen für Rcd-1 ergaben ein erhöhtes Vorkommen des Proteins in Thymus, glattem Muskel und Milz (Kersten, 1999). Das Protein ist kernständig lokalisiert (Schürmann, 2000).

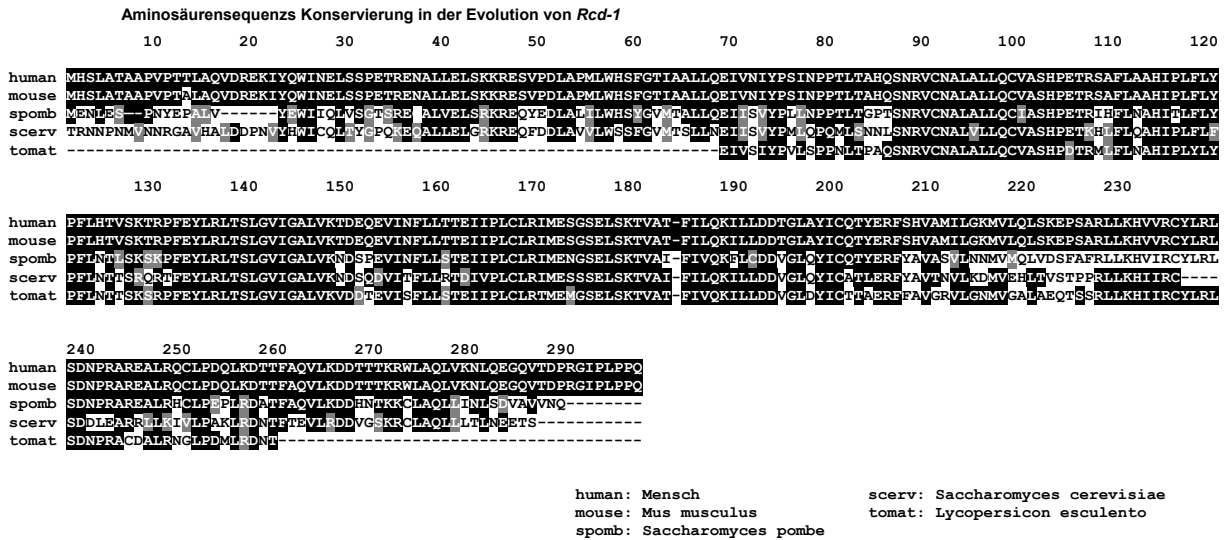


Abbildung 5: Sequenzvergleich von *Rcd-1* in verschiedenen Spezies; schwarz= identische AS, grau= ähnliche AS, -= Lücke

Die Intron/Exon Verteilung von *Rcd-1* im Maus-Gen (*Swiss Webster NIH mice*) konnte mittels PCR ermittelt werden (siehe Abbildung 6) (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe H. Wolfes).

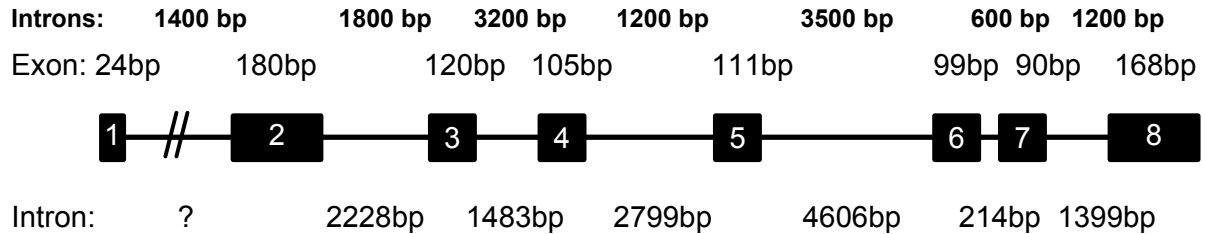


Abbildung 6: Intron/Exon Verteilung auf dem *rcd-1*-Gen (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe H. Wolfes)

Im *Two-Hybrid* System (Siegert, 1998) (Köder siehe Abbildung 7) wurde eine Wechselwirkung von *Rcd-1* mit c-Myb nachgewiesen. Die Bindung von c-Myb an *Rcd-1* konnte mit Peptid-Bindungsversuchen auf die Aminosäuren 375-399 von c-Myb eingegrenzt werden (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe H. Wolfes).

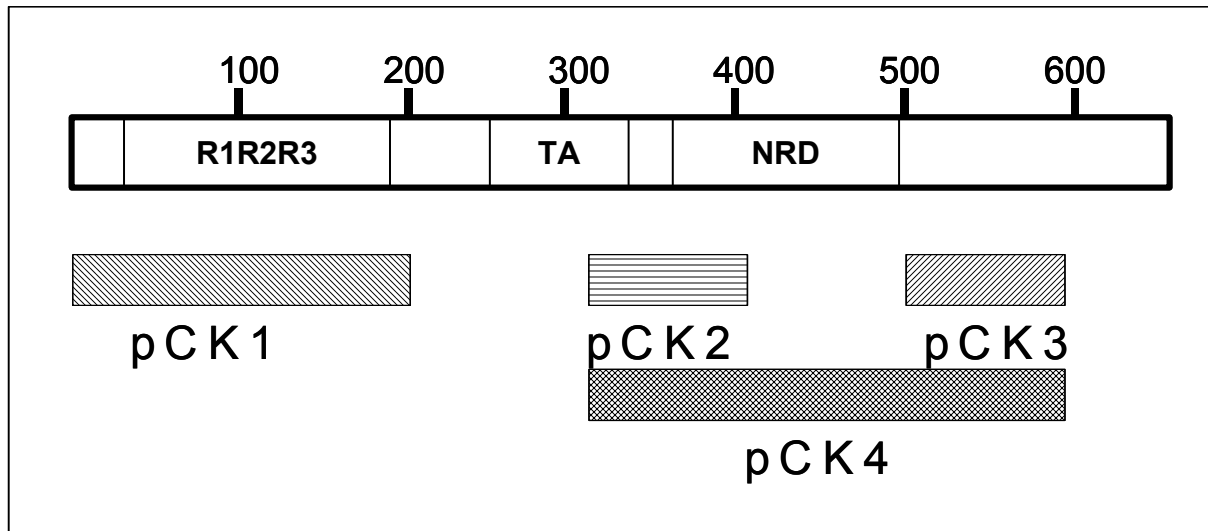


Abbildung 7: Köder des *Two-Hybrid* Systems mit c-Myb. R1-R3 = Myb DNA-Bindungs-Domäne, TA = Transaktivierende Domäne, NRD = Myb negativ regulierende Domäne, pCK1-4 = Eingesetzte Ködersequenzen im *Two-Hybrid* System (Siegert, 1998)

1.3.1.1 Besonderheiten von Rcd-1

Die Analyse des Promotorbereiches von Rcd-1 hat ergeben, dass sich weder bei -25 Bp eine TATA- noch bei -75 Bp eine CAAT-Box findet, wie dies sonst häufig in Promotoren der Fall ist. Stattdessen konnten CpG-Inseln identifiziert werden, die vermutlich an der Regulation des rcd-1 Gens maßgeblich beteiligt sind (Haas, 2000).

1.3.1.2 CpG-Inseln

Bei den CpG-Inseln handelt es sich um ein Motiv, das sich häufig im Bereich *upstream* vor dem Transkriptionsstart befindet. CpG-Inseln treten meistens in hochregulierten Promotorregionen von Genen auf, wie zum Beispiel vor Transkriptionsfaktoren (Antequera *et al.*, 1999). Die meisten, aber nicht alle, bisher entdeckten CpG-Inseln befinden sich vor konstitutiv exprimierten, gewebespezifischen Genen (Vassilev *et al.*, 1990), was ihre wichtige Rolle bei der Steuerung der Expression von hochregulierten Genen untermauert.

Ein auffälliges Merkmal der CpG-Inseln ist die fehlende Methylierung der CpG's, während außerhalb von CpG-Inseln die Abfolge CpG in eukaryontischen Zellen häufig methyliert ist. Diese Methylierung wird offenbar benutzt, um Gene selektiv zu regulieren.

Mehrere Theorien existieren darüber, wie die Methylierung der CpG's gesteuert wird. Es ist gesichert, dass eine Methylierung der CpG's zu einer Inaktivierung des dazugehörigen Gens führt. Das Methylierungsmuster, das *imprinting*, wird schon im embryonalen Stadium festgelegt (Reik *et al.*, 1987) (Mann *et al.*, 2000). Ein möglicher Mechanismus der Regulation wäre, dass die Bindung von Transkriptionsfaktoren und die anschließende Entwindung der DNA die erst 1998 entdeckten (Okano *et al.*, 1998) *de novo* DNA-Methyltransferasen inhibieren und somit eine Methylierung verhindert wird. Bei der Teilung der Zelle kopiert die DNA-Methyltransferase 1 (Dnmt1) das Methylierungsmuster, und die CpG-Inseln werden nicht methyliert. Nach der Differenzierung könnte eine weitere *de novo* DNA-Methyltransferase aktiviert werden, welche die CpG-Inseln methyliert und das betroffene Gen inaktiviert.

1.3.2 Weitere Kofaktoren von c-Myb

Transkriptionsfaktoren, die in der Zelle Funktionen wie Zellteilung oder Differenzierung regulieren, müssen einer sehr genauen Kontrolle unterliegen. Diese Kontrolle wird bei c-Myb unter anderem durch die Wechselwirkung mit Kofaktoren erreicht. Viele dieser Proteine konnten in den vergangenen Jahren identifiziert werden (Armstrong *et al.*, 1998). Einige von ihnen sind in der Lage, c-Myb direkt zu binden, andere üben ihre regulierende Funktion indirekt aus. Höchst wahrscheinlich fehlen aber immer noch zahlreiche Kooperationspartner, um die molekulare Maschinerie zur Steuerung von c-Myb hinreichend zu verstehen (Kadonaga, 1998).

Zu der Klasse der indirekt bindenden Faktoren gehören Proteine wie Ets-12 (Dudek *et al.*, 1992) oder BZLF1 (Kenney *et al.*, 1992). Diese Faktoren sind in der Lage, in Kooperation mit c-Myb Zelltyp-spezifisch *enhancer* oder Promotoren zu aktivieren (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Aktivität der Kofaktoren von c-Myb (nach (Ness, 1996))

<i>Funktion</i>	<i>Kofaktor</i>
indirekt bindend, aktivieren Promotoren/ <i>enhancer</i>	Ets-1, 2, BZLF
direkt bindend, Interaktion mit DNA-bindenden Faktoren	C/EBPβ
direkt bindend, Interaktion mit Transkriptionsmaschinerie	p300, CBP
direkt bindend, beeinflussen Aktivität von c-Myb	Rcd-1

Die andere Klasse sind Kofaktoren, die direkt an c-Myb binden können. Hierzu gehören unter anderem DNA-Bindende Transkriptionsfaktoren. Eine zweite Gruppe sind Transkriptionskoaktivatoren, die mit der Transkriptionsmaschinerie in Interaktion treten können. Und drittens gibt es noch solche Faktoren, die an c-Myb binden und so seine Aktivität beeinflussen können. Die dabei ausgeübte Funktion kann aktivierend oder inhibitorisch sein (Ness *et al.*, 1994) (Übersicht Abbildung 8).

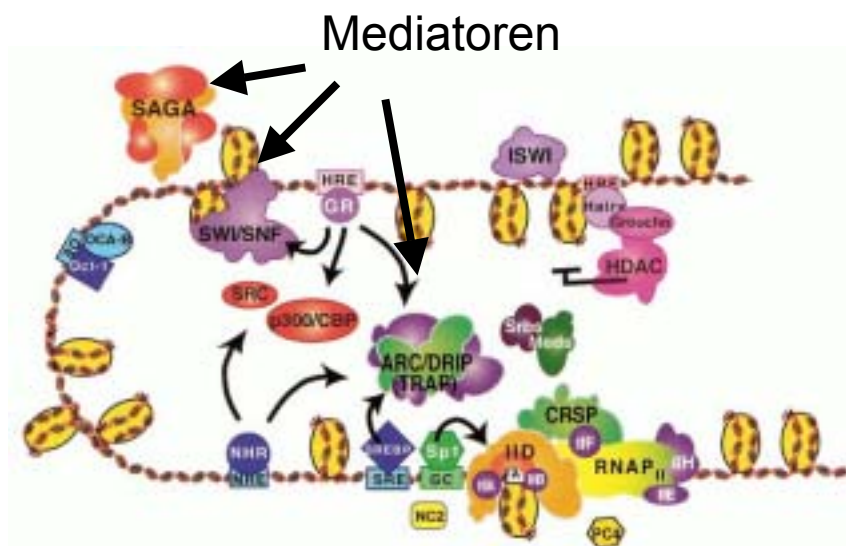


Abbildung 8: Modell der Transkriptionsregulation; modifiziert nach (Lemon *et al.*, 2000)

Für C/EBP β wurde eine direkte Bindung an c-Myb *in vivo* nachgewiesen. Dabei konnte eine Aktivierung des *mim-1* Promotors durch die beiden Transkriptionsfaktoren gezeigt werden (Burk *et al.*, 1993). Die Interaktion erfolgt offenbar über die DNA-Bindungsdomänen der beiden Proteine, was anschaulich macht, dass die DBD weitere Funktionen über die DNA-Bindung hinaus vermittelt. Zu der zweiten Gruppe von c-Myb Kofaktoren gehören die Faktoren CBP und p300. Diese beiden Proteine wurden als Koaktivatoren für zahlreiche Transkriptionsfaktoren beschrieben und sind ubiquitär in den Zellen zu finden (Arany *et al.*, 1994). Sowohl CBP als auch p300 besitzen Histonacetyltransferase- Aktivität (Ogryzko *et al.*, 1996) und sind am *Chromatinremodelling* beteiligt (Armstrong *et al.*, 1998). CBP wurde als Koaktivator von CREB identifiziert, wobei c-Myb und CREB die gleiche Domäne an dem CBP Protein erkennen und binden (Kiewitz, 1997). Interessanterweise ist CBP in der Lage, mit C/EBP β zu interagieren und seine Aktivität zu steigern, was ihm eine Rolle als *bridging* Faktor zwischen c-Myb und C/EBP β zuweist (siehe Abbildung 9) (Dai *et al.*, 1996).

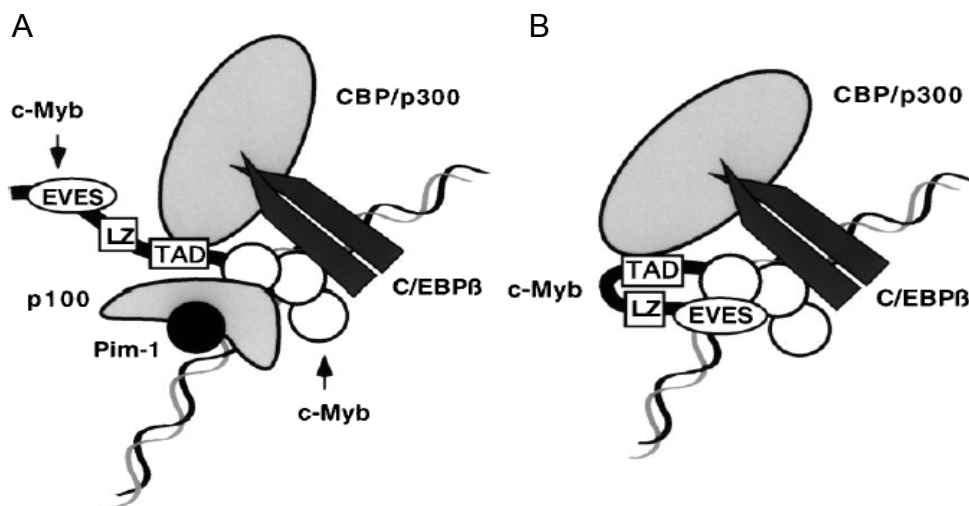


Abbildung 9: Regulation von c-Myb durch Kofaktoren; modifiziert nach (Ness, 1999)

Ein weiterer Interaktionspartner von c-Myb ist p100, das eine Domäne besitzt, die dem EVES-Motiv in c-Myb ähnlich ist und somit auch erste Hinweise auf eine intramolekulare Regulation der intermolekularen Kontakte von c-Myb lieferte

(Levenson *et al.*, 1998). p100 wurde als Interaktionspartner der Serin/Threonin-Proteinkinase Pim-1 identifiziert, die wie c-Myb in unreifen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, und die von STAT-Faktoren reguliert wird (Miura *et al.*, 1994). STAT-Proteine sind Bestandteil der Cytokin-Rezeptor Enzymkaskade. p100 und Pim-1 stellen vermutlich Komponenten einer neuen Signalkaskade ausgehend von hämatopoetischen Cytokin-Rezeptoren zur Regulation der c-Myb Aktivität dar. Als ein möglicher Gegenspieler für c-Myb wurde zum Beispiel der Transkriptionsfaktor RAR α identifiziert. Dominant negative Mutanten von RAR α konnten in Gewebekulturen die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen unterdrücken. In Reporterassays zeigte sich das Protein als Inhibitor von c-Myb (Pfitzner *et al.*, 1998). Ähnliche Daten wurden für den Transkriptionsfaktor c-MAF erhalten, der starke Homologie zu C/EBP β aufweist (Hedge *et al.*, 1998). Andere Inhibitoren wie p160 oder p67 binden nicht direkt an die DNA, sondern fungieren als Adaptorproteine (Tavner *et al.*, 1998) (Übersicht Abbildung10).

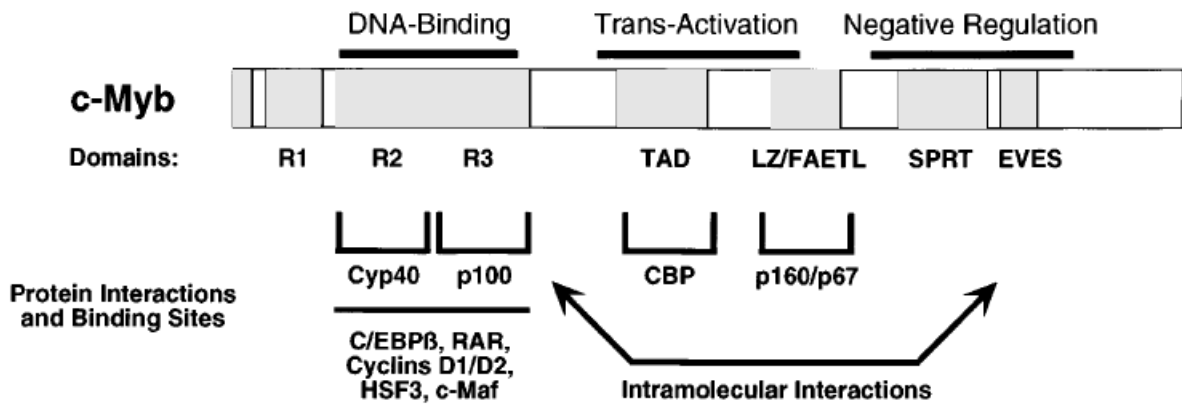


Abbildung 10: Überblick über einige Wechselwirkungspartner von c-Myb mit deren Bindungsorten (Ness, 1996)

1.3.3 c-Myb und die Differenzierung

Schon früh wurde die Bedeutung von c-Myb für die Hämatopoese entdeckt (Eva *et al.*, 1982). Befunde, dass c-Myb vorwiegend in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Thiele *et al.*, 1988) und die Tatsache, dass das Expressionsniveau reziprok zum Entwicklungsgrad ist (Westin, Gallo, Arya, Eva, Souza, Baluda, Aaronson and Wong-Staal, 1982), sind deutliche Hinweise hierfür. Nach der Deletion des c-myb-Gens ist sowohl die myeloide (Duprey *et al.*, 1985), als auch die lymphoide Entwicklung gestört (Badiani *et al.*, 1994). Megakaryozyten können jedoch noch gebildet werden (siehe Abbildung 11).

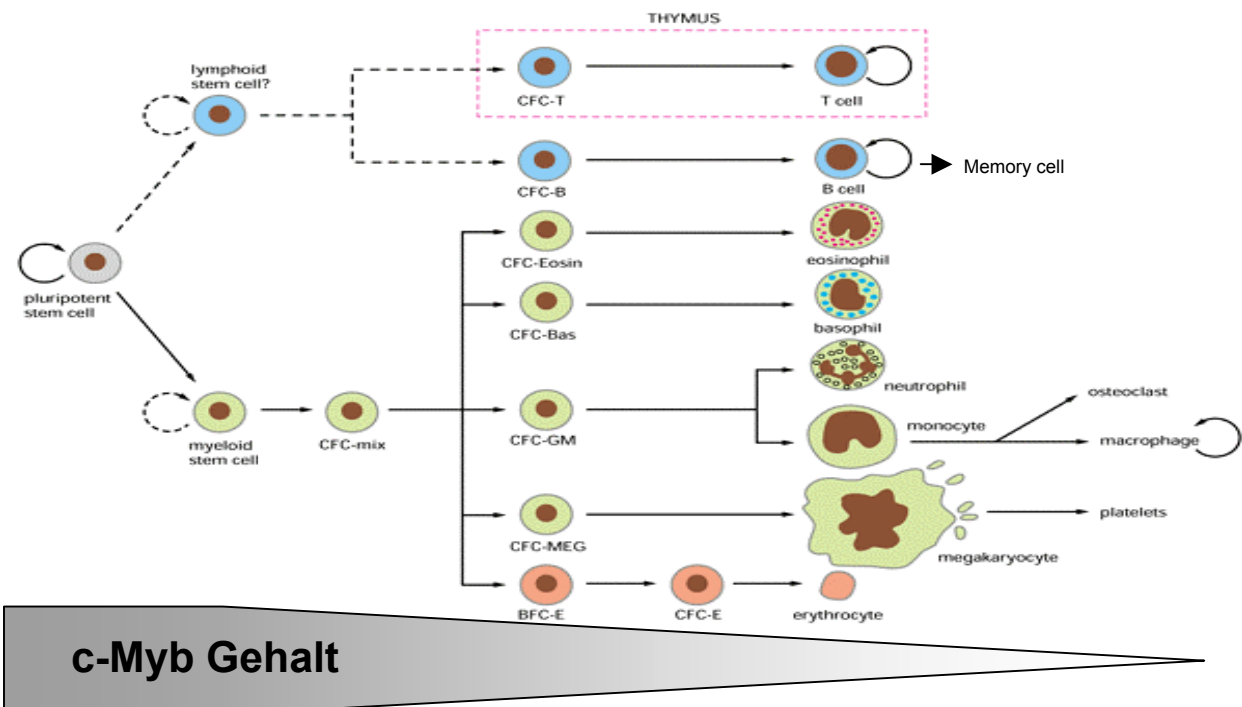


Abbildung 11: Entwicklung von Blutzellen aus pluripotenten Stammzellen (Roitt *et al.*, 1985)

Bei der Klärung der Frage, auf welche Weise c-Myb in die zellulären Vorgänge eingreift, halfen die Untersuchungen an den beiden retroviralen v-Myb Formen AMV und E26. Beide Formen weisen im Vergleich zu c-Myb N- und C-terminale Deletionen auf. Betroffen von den Deletionen ist dabei unter anderem die negativ regulatorische Domäne (Ness, 1996). AMV und E26 sind in der Lage, Zellen zu transformieren. Obwohl sie eine ähnliche Struktur aufweisen, transformieren sie die

Zellen auf unterschiedliche Weise. E 26 transformiert Myeloblasten, die sich zu Monozyten oder Granulozyten differenzieren und von dem Wachstumsfaktor cMGF (*myelomonocytic growth factor*) abhängig sind.

Im Gegensatz dazu transformiert AMV die Zellen später in der Entwicklung, also Zellen, die sich zu Monozyten oder Makrophagen differenzieren können, aber nicht mehr zu Granulozyten. Dabei sind sie nicht von cMGF abhängig, da die Zellen in diesem Stadium der Entwicklung ihre eigenen Wachstumsfaktoren produzieren können (Dini *et al.*, 1995). In beiden Fällen resultieren unvollständig gereifte Zelltypen.

Warum die beiden Onkogene so unterschiedliche Wirkungen in den Zellen zeigen, konnte geklärt werden nachdem man herausgefunden hatte, dass sie verschiedene Zielgene aktivieren können (Graf, 1998). So ist E26, zusammen mit C/EBP α oder β , in der Lage den *mim-1* Promotor zu aktivieren (Graf, 1992). Das AMV-Myb hingegen aktiviert das GBX2-Gen, das einen Transkriptionsfaktor mit Homöodomäne kodiert (Kowenz-Leutz *et al.*, 1997). Das GBX2-Gen induziert in den Zellen vermutlich die Produktion von cMGF (siehe Abbildung 12). Die Ursache, dass AMV nicht an den *mim-1* Promotor binden kann, ist in drei Punktmutationen zu finden. Diese befinden sich zwar in der DNA-Bindungsdomäne, betreffen aber hauptsächlich die Wechselwirkung mit anderen Proteinen. Mit Cyp-40, einem Cyclosporin-A-bindenden Protein, wurde ein Protein gefunden, das über seine C-terminale Region an E26 aber nicht an AMV-Myb binden kann (Leverson *et al.*, 1998). Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung von Myb-Kofaktoren und legen den Schluss nahe, dass unterschiedliche Formen von Myb mit unterschiedlichen Sätzen an Kofaktoren interagieren, um wiederum spezifische Sätze an Zielgenen zu regulieren.

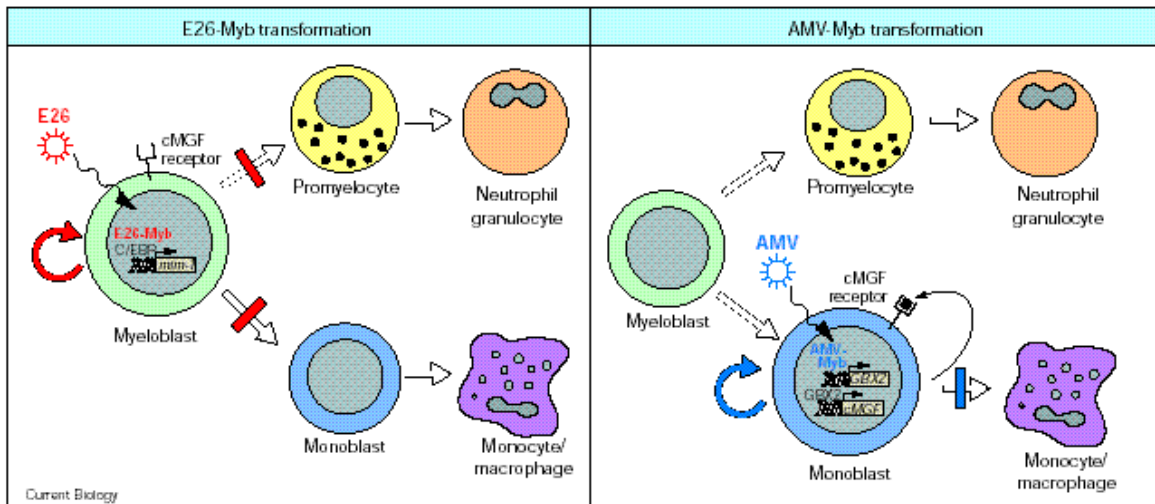


Abbildung 12: Auswirkung der Transformation durch E-26-Myb und AMV-Myb auf myeloide Zellen bei der Differenzierung, modifiziert nach (Graf, 1998)

Eine mögliche Interpretation dieser Ergebnisse bietet ein von Graf vorgeschlagenes Modell zur Rolle von c-Myb in der Differenzierung. Dieses schlägt die Existenz von zwei Aktivitätszuständen des c-Myb Proteins vor. Zunächst liegt hierbei das c-Myb in seinem normalen Aktivitätszustand vor, in dem es in den Myeloblasten die Expression des *mim-1* Promotors erlaubt. Eine Modifikation in den Myeloblasten durch Ras oder Tyrosinkinasen führt dazu, dass c-Myb das GBX2-Gen aktivieren kann und somit die Differenzierung zu Monoblasten eingeleitet wird (Graf, 1998). Dieses Modell wird von Daten gestützt, die belegen, dass E26-transformierte Vorläuferzellen die Expression von C/EBPβ steigern, während andere Stammzellspezifische Faktoren (zum Beispiel GATA) heruntergeregelt werden (Kulesa *et al.*, 1995).

Dieses Modell bezieht allerdings zahlreiche Faktoren, für die eine Wechselwirkung mit c-Myb beschrieben wurde, nicht ein und darf daher nur als ein Aspekt der vielfältigen Regulationsmöglichkeiten durch c-Myb verstanden werden. So wurden bei der T-Zellentwicklung weitere Kofaktoren für c-Myb beschrieben, die an der Differenzierung beteiligt sind (Frampton *et al.*, 1996).

2 Material und Methoden

In dieser Promotionsarbeit wurden Chemikalien der folgenden Firmen verwendet: Amersham, Bayer, BioRAD, Biozym, Clontech, Fluka, Gibco BRL, Invitrogen, Merk, Qiagen, Riedel-de-Haen, Roche, Sigma und Stratagene. Der Reinheitsgrad der Chemikalien entsprach dabei *pro analysi*.

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen, Modifikationsenzyme und Polymerasen stammen von den Firmen Amersham, Boehringer-Ingelheim, MBI-Fermentas, New England Biolabs, Promega, Qiagen und Stratagene.

Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Beckman, Biozym, Boehringer-Ingelheim, Clontech, Eppendorf, Falcon, Gilson, Greiner, Millipore, Nunc, PALL, Pharamcia, Qiagen, Sarstedt, Schleicher & Schüll und Whatmann bezogen.

Die bei Klonierungen eingesetzten Oligonukleotide und Primer der PCR-Reaktionen wurden von der Firma MWG synthetisiert. Sequenzierungen wurden von gac oder MWG durchgeführt.

2.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

2.1.1 Verwendete Bakterienstämme

Bei den in der Arbeit verwendeten *Escherichia coli*-Stämmen handelt es sich um K12-Sicherheitsstämme. Sie wurden für Arbeiten mit Plasmid-DNA eingesetzt.

TG1

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

Escherichia coli TG1 wurde für Arbeiten mit Plasmid-DNA eingesetzt. Hauptsächlich fand er Verwendung zur Amplifikation von Phagen und zur Amplifikation der Plasmide pCMV-Myc, pCMV-E2F-1, pCMV-CBP und pCMV β -p300.

HB101

Genotyp: F⁻, *thi-1*, *hsdS20* (*r_B⁻*, *m_B⁻*), *recA13*, *ara-14*, *leuB6*, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20* (*str^r*), *xyl-5*, *mtl-1*, *supE44*, λ^- .

Escherichia coli HB101 wurde zur Amplifikation von präparierten Plasmiden aus Hefezellen eingesetzt.

LK111 (λ)

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

Escherichia coli LK111(λ) wurde zur Plasmidamplifikation und bei der Proteinexpression eingesetzt.

DH5(α)

Genotyp: ϕ 80d, *lacZ Δ M15*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, (*r_K⁻m_K⁺*), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argF*), U169, F⁻.

Escherichia coli DH5(α) wurde zur Plasmidamplifikation und bei der Proteinexpression eingesetzt.

Top10F'

Genotyp: F' {*lacI^qTn10*(Tet^R)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80, *lacZ Δ M15*, Δ *lacX*, 74 *deoR*, *recA1*, *araD139*, Δ (*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*, *endA1*, *nupG*.

Escherichia coli Top10F' wurde zur Vermehrung des Plasmids pcDNA1.1/Amp und aller daraus abgeleiteten Plasmide verwendet. Es handelt sich um einen rekombinationsdefizienten Stamm für die stabile Replikation von *high-copy-number*-Plasmiden. Der Stamm ist *recA1* positiv für eine erhöhte Stabilität des Inserts, *endA* für eine bessere Plasmid-Qualität bei Minipräparation und *hsdRMS* für geringe Spaltungsaktivität endogener Nukleasen. *Blue/white-screening* wird durch den *lacZ Δ M15* Genotyp ermöglicht. Der Stamm trägt eine Tetracyclin-Resistenz auf dem F-Episom.

2.1.2 Verwendete bakterielle Vektoren

pGEX-Vektoren

Die von der Firma Amershan bezogenen pGEX-Vektoren wurden für die induzierbare intrazelluläre Expression von Genen oder Genfragmente als GST-Fusionsproteine (Glutathion-S-Transferase) entwickelt. Durch den GST-Anteil lassen sich diese Proteine über GSH-Sepharose aufreinigen. Die Expression steht unter Kontrolle des *tac*-Promotors. Das Plasmid trägt den *lac*-Repressor (*lacI^q*). Ein *pBR322 ori* ermöglicht die Replikation in *E.coli*. Der Vektor besitzt eine Ampicillinresistenz zur Selektion.

Die pGEX-Vektoren sind in den drei unterschiedlichen Leserastern erhältlich (pGEX-4T1, pGEX-4T2 und pGEX-4T3), was eine Klonierung ohne Verschiebung des Leserasters erlaubt.

Die Vektoren besitzen nach dem GST-Anteil eine Thrombinschnittstelle, die eine Abspaltung des GST von dem zu exprimierenden Protein ermöglicht (siehe Abbildung 13).

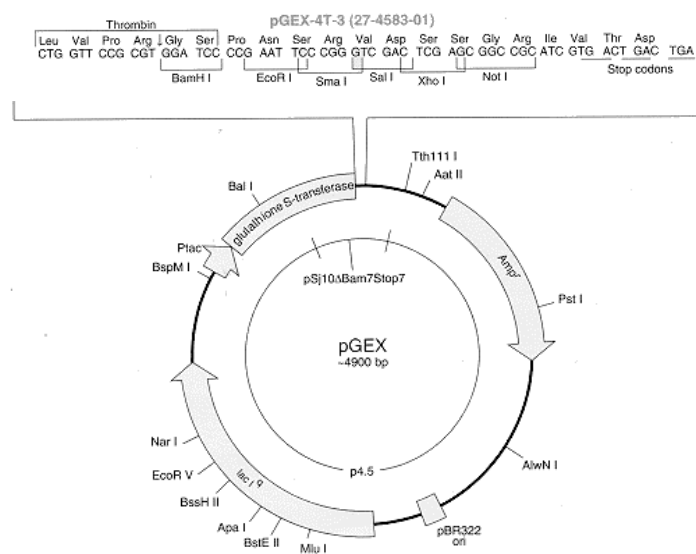


Abbildung 13: Abbildung von pGEX-4T3

pQE-Vektoren

Die von der Firma Qiagen bezogenen pQE-Vektoren enthalten eine kodierende Sequenz für sechs aufeinanderfolgende Histidine ($(\text{His})_6$ -tag). Dieser Fusionsanteil ermöglicht die Aufreinigung mittels Ni^{2+} -NTA-Agarose Affinitätschromatographie. Die

Vektoren enthalten einen ColE1-ori für die Replikation in *E.coli*. Sie besitzen einen T5-Promotor, der sich aus dem T5-Phagen Promotor PN25 und dem *lac*-Operator zusammensetzt und durch IPTG induzierbar ist. Die Vektoren besitzen eine Ampicillinresistenz.

Die in der Arbeit verwendeten Vektoren pQE30, pQE31 und pQE32 repräsentieren die drei unterschiedlichen Leseraster und ermöglichen ein Klonieren ohne Verschiebung des Leserasters (siehe Abbildung 14).

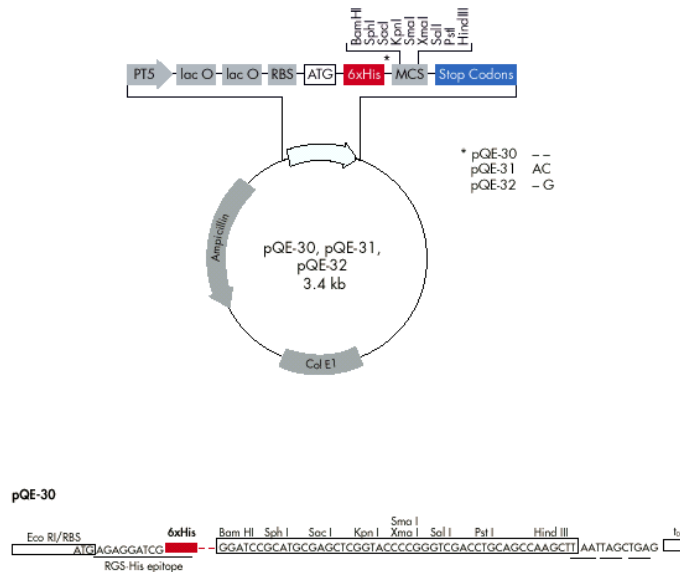


Abbildung 14: Abbildung der pQE-Vektoren

2.1.3 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E.coli* erfolgt in LB-Medium-Flüssigkultur im Schüttelwasserbad oder auf LB-Agarplatten im Brutschrank für mindestens 8 Stunden oder über Nacht bei 37°C. Eine Selektion der transformierten Zellen erfolgt dabei durch Zugabe von Antibiotika in folgenden Konzentrationen (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Antibiotikakonzentrationen in Medien

Antibiotikum	Flüssigmedium [µg/ml]	Festmedien [µg/ml]
Ampicillin	100	75
Kanamycin	30	35/30
Kloramphenicol	20	30
Tetracyclin	15	15

Medien zur Kultivierung von *Escherichia coli*

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

10 g Yeast-Extract

10 g Casein

5 g NaCl

ad 1000 ml dd H₂O; pH 7,5 einstellen, autoklavieren

LB-Platten für *E.coli*

10 g Pepton

10 g Hefeextrakt

5 g NaCl

15 g Agar

ad 1000 ml dd H₂O; pH 7,0 einstellen, autoklavieren, ggf. vor dem Gießen bei etwa 40°C die in Tabelle 2 angegebene Menge Antibiotikum zugeben.

2.1.4 Transformation von *Escherichia coli*

Chemische Transformation

Herstellung kompetenter Zellen für chemische Transformation

Die kompetenten Zellen werden nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt (Biolabs, 1996). Dabei können Transformationseffizienzen von etwa 10^7 cfu/ μ g Plasmid erreicht werden. Die so hergestellten Zellen können ein halbes Jahr bei -70°C gelagert werden.

Von einer 20 ml Über-Nacht-Vorkultur des gewählten *E.coli*-Stammes wird eine 250 ml LB-Flüssigmedium-Kultur 1:100 beimpft und mit 20 mM MgCl₂ versetzt. Die Kultur wird 2-3 Stunden bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert, bis eine Zelldichte von $OD_{560\text{ nm}} = 0,4-0,6$ erreicht wird, was dem Beginn der logarithmischen Wachstumsphase entspricht. Die Zellen werden bei 4000 x g und 4°C für 5 min sedimentiert.

Der Überstand wird dekantiert und die Zellen in 100 ml eiskalter TFB1-Lösung resuspendiert. Die Zellsuspension wird für 5 min auf Eis inkubiert und erneut bei

1300 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und die Zellen in 10 ml TBF2-Lösung aufgenommen und auf Eis für 50 min inkubiert. Anschließend wird die Zellsuspension in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gelagert werden die kompetenten Zellen im Tiefkühlschrank bei -70°C. Die Zellen sind ungefähr ein halbes Jahr kompetent.

Puffer und Lösungen für die chemische Transformation

TFB1-Lösung

30 mM	KAc
100 mM	RbCl
10 mM	CaCl ₂
50 mM	MnCl ₂
15 %(w/v)	Glycerin
pH 5,8 mit 0,1 M Essigsäure einstellen, autoklavieren	

TFB2-Lösung

10 mM	MOPS
10 mM	RbCl
75 mM	CaCl ₂
15 %(w/v)	Glycerin
pH 6,5 mit 0,1 N KOH einstellen, autoklavieren	

Transformation chemisch kompetenter Zellen

Für die Transformation von *E.coli* Zellen werden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Zu den auftauenden Zellen werden 100-150 ng Plasmid-DNA gegeben und für mindestens weitere 30 min auf Eis belassen. Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme (siehe 2.1.1) werden für 90 Sekunden auf 42°C erhitzt (Hitzeschock) und anschließend wieder auf Eis gestellt. Bei Ligationsansätzen können die Zellen mit LB-Medium versetzt werden und bei 37°C für 1 Stunde inkubiert werden. Im Anschluss werden die Zellen bei geringer Drehzahl (3000-4000 rpm) abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen werden im verbleibenden Flüssigkeitsvolumen resuspendiert und auf LB-Selektionsplatten mit dem entsprechendem Antibiotikum kultiviert. Die Platten können nach dem Wachstum bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert werden.

Elektroporation

Herstellung elektrokompetenter Zellen

Neben der chemischen Transformation wurde auch die Elektroporation verwendet. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt in der höheren Transformationseffizienz, die bei etwa 10^9 - 10^{10} cfu/ μ g Plasmid liegt.

Zur Herstellung der kompetenten Zellen wird 1 l LB-Medium mit einer Übernachtskultur 1:100 angeimpft und circa 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Bei einer Zelldichte von $OD_{560\text{ nm}} = 0,4$ - $0,5$ wird das Kulturgefäß für 30 min auf Eis gestellt. Anschließend werden die Zellen für 15 min bei 4000 g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 1 l eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Waschvorgang wird mit 500 ml und 20 ml 10% Glycerin wiederholt. Die Zellen werden anschließend in 2 bis 3 ml 10% Glycerin resuspendiert. Die kompetenten Zellen werden zu 40 μ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt. Die Zellen sind nur wenige Tage kompetent und sollten möglichst bald verwendet werden.

Transformation der elektrokompetenten Zellen

Ein Aliquot elektrokompetenter Zellen wird mit maximal 4 μ l Plasmid-DNA (etwa 100 ng/ μ l) versetzt und zwei min auf Eis inkubiert. Nach Überführung des Ansatzes in eine eisgekühlte 1 mm-Küvette wird mittels eines Elektroporators (Modell 2510, Firma Eppendorf) ein 4 ms langer Spannungsimpuls von 1800 V erzeugt. Die Zellen werden eine Stunde lang in 1 ml LB-Medium bei 37°C inkubiert und anschließend auf Selektionsplatten oder in Flüssigmedium mit Antibiotikum überführt.

2.1.5 Expression von Proteinen

Die Expression von Proteinen erfolgte mittels pGEX- (GST-Fusionsproteine) oder pQE-Vektoren ((His)₆-tag-Proteine). Vor der Expression muss das entsprechende Gen im Leseraster in den Vektor kloniert werden (siehe 2.1.2).

2.1.5.1 Expressionstest

Für einen Expressionstest wird eine 20 ml LB^{Amp}-Kultur mit dem Expressionsplasmid versetzt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Vor der Induktion mit Isopropyl- β -D-

thiogalaktosid (IPTG) wird eine 1 ml-Probe entnommen, bei 5000 g 5 min abzentrifugiert, das Pellet in 20 µl Laemmliauftragspuffer (LAP) aufgenommen und bei 95°C 10 min aufgeköcht. Jeweils stündlich nach der Induktion mit IPTG entnimmt man weitere 1 ml-Proben und nimmt sie in 20 µl LAP auf. Die Proben werden anschließend auf einem SDS-PAAGE (siehe 2.5.8.4) analysiert. Wird das Protein in ausreichenden Mengen produziert, sollte im Vergleich zur nicht induzierten Probe eine zusätzliche Proteinbande in der erwarteten Größe zu sehen sein.

2.1.5.2 Durchführung der Proteinexpression

Für die Proteinexpression werden 500 ml LB^{Amp}-Medium mit einer über-Nacht-Vorkultur 1:100 angeimpft und bei 37°C inkubiert. Die Inkubationstemperatur kann bei der Produktion von zelltoxischen Proteinen auf bis zu 30°C gesenkt werden, um ein Absterben der *E.coli* Zellen zu minimieren. Bei Erreichen einer Zelldichte von OD_{600 nm} = 0,8-0,9 erfolgt die Induktion mit Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG). Die Endkonzentration beträgt dabei für die pGEX-Vektoren 0,1-0,2 mM und bei den pQE-Vektoren 1-2 mM. Anschließend werden die Zellen für weitere ein bis drei Stunden bei 37°C oder 30°C inkubiert. Die Zellsuspension wird bei 4000 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet kann bei -20°C gelagert oder wie unter 2.6.1 beschrieben aufgearbeitet werden.

2.1.5.3 Fermentation

Für die Aufreinigung größerer Proteinmengen erfolgt die Kultivierung in einem 10 l-Fermenter. Um sterile Bedingungen zu erreichen, wird der Fermenter mit 8 l ddH₂O befüllt und 14 Stunden bei 120°C inkubiert.

Nach dem Abkühlen auf circa 45°C werden 1 l steriles 10 x LB-Medium, 3 ml Extran 31 und die entsprechende Menge Antibiotika zugegeben. Der Fermenter wird mit 1 l einer über-Nacht-Vorkultur angeimpft und bei 37°C zu einer OD_{600 nm} = 0,7-0,9 inkubiert. Die Induktion erfolgt wie unter 2.1.5 beschrieben mit der entsprechenden Menge IPTG. Nach zweistündiger Expression wird der Fermenterinhalt bei 4000 g für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 500 ml PDL resuspendiert. Die Zellen können bei -20°C gelagert oder wie unter 2.6.1 beschrieben sofort aufgearbeitet werden.

Verwendete Lösungen für die Fermentation

PDL

30 mM	KP _i , pH 7,5
100 mM	DTT
0,01 %	Lubrol

2.2 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.1 *Two-Hybrid-System*

Eine Möglichkeit Wechselwirkungen zwischen Proteinen zu detektieren, bietet das *Two-Hybrid-System*, das von Fields und Song entwickelt wurde (Fields *et al.*, 1989). Das System ist sowohl geeignet putative Wechselwirkungen zu bestätigen als auch neue Wechselwirkungen durch *screenen* von cDNA-Bibliotheken zu finden. Der Vorteil gegenüber bakteriellen Systemen oder *in vitro*-Methoden, liegt in den biologischen Bedingungen während des Verfahrens, die nahe an den natürlichen Bedingungen für die Proteine sind. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einer Variante des *Two-Hybrid-Systems* gearbeitet, dem Matchmaker *Yeast-Two-Hybrid-System* der Firma Clontech.

Das Prinzip des *Two-Hybrid-Systems* beruht auf der Tatsache, dass viele Proteine sich in funktionelle Domänen gliedern lassen. Man kann diese Domänen separieren, ohne dass sie ihre Funktion verlieren. Kommen nun zwei dieser Domänen physikalisch aneinander, können sie ihre ursprüngliche Funktion wieder gemeinsam ausführen (Brent *et al.*, 1985).

Diese Möglichkeit macht man sich im *Two-Hybrid-System* zu nutze, indem DNA-Bindungsdomäne und die transaktivierende eines Transkriptionsfaktors als Fusionsproteine mit je einem fremden Proteinanteil expremiert werden. Falls die beiden neuen Proteinanteile miteinander wechselwirken, ist die Funktion des Transkriptionsfaktors wiederhergestellt. Seine Aktivität kann über die exprimierten Markerproteine nachgewiesen werden. Durch die Kopplung von Geno- und Phänotyp kann durch Sequenzierung der Wechselwirkungspartner identifiziert werden. In den hier beschriebenen Versuchen wurden die von Clontech mitgelieferten Vektoren pAS2-1 und pGAD10 verwendet.

2.2.1.1 Verwendeter Hefestamm

In dieser Arbeit wurde mit dem Hefestamm Y190 gearbeitet. Er besitzt den Genotyp:

MATa, ura3-52, his3-200, ade 2-101, lys2-801, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, cyh2.

Saccharomyces cerevisiae Y190 der Firma Clontech ist ein Abkömmling des Hefestammes Y153 (Durfee, 1993). Er ist auxotroph für Tryptophan und Leucin. Ein HIS3-Reporter gen wird von der GAL1-UAS und einem Minimalpromotor kontrolliert, der beide HIS3-TATA-Boxen enthält. Das lacZ-Reporter gen steht unter der Kontrolle eines intakten GAL1-Promotors. Durch die TC-TATA-Box kann es zu unkontrollierter, HIS3-Expression kommen, die durch Zugabe von 3-AT unterdrückt werden muss.

2.2.2 Lagerung von Hefe-Zellen

Für regelmäßige Arbeiten sollte ein *working stock* der Hefe-Stämme angelegt werden.

Zum Anlegen eines *working stocks* werden 50 µl der Hefekultur auf eine YPD-Agarplatte (siehe 2.2.3) aufgetragen und 3-5 Tage bei 30°C inkubiert. Diese Platte kann mit Parafilm verschlossen bei 4°C 1-2 Monate gelagert werden. Um diese Zeitspanne zu vergrößern, kann von dieser Platte wieder ein neuer *working stock* angelegt werden.

Für eine langfristige Lagerung sollten Glycerinkulturen angelegt werden. Hierfür wird eine einzelne Kolonie des *working stocks* in 500 µl YPD-Medium resuspendiert und anschließend mit 500 µl 50%iger Glycerinlösung versetzt. Die Suspension wird 30 min auf Eis inkubiert und die Zellen bei -70°C aufbewahrt. Die Zellen sind so etwa ein Jahr haltbar.

2.2.3 Kultivierung

S. cerevisiae wächst bei 30°C auf Vollmedium (zum Beispiel YPD) oder auf entsprechenden SD-Mangelmedien. In der exponentiellen Wachstumsphase beträgt die Generationszeit etwa 180 min.

Durch Messung der Trübung bei 600 nm können folgende Wachstumsphasen unterschieden werden. Mit der Näherung $OD_{600\text{ nm}} = 0,1 \cong 3 \times 10^6$ Zellen/ml lässt sich die Zellzahl abschätzen.

- Anlaufphase

- Exponentielle Phase

* *early* log-Phase $OD_{600} = 0,4 \Rightarrow \leq 1 \times 10^7$ Zellen/ml

* *mid* log-Phase $OD_{600} = 0,4-1,7 \Rightarrow 1-5 \times 10^7$ Zellen/ml

* *late* log-Phase $OD_{600} = 1,7-6,6 \Rightarrow 5 \times 10^7 - 2 \times 10^8$ Zellen /ml

- Stationäre Phase

- Absterbephase

Medien zur Kultivierung von Hefe

YPD-Medium und YPD-Festplatten

2% (w/v) Pepton

1% (w/v) Hefeextrakt

2% (w/v) Agar (nur für Festplatten)

pH 5,8 einstellen, autoklavieren, auf 50°C abkühlen und

2% (v/v) autoklavierte Glukoselösung dazugeben

SD-Medium und SD-Festplatten/Mangelmedien

0,67% (w/v) *Yeast nitrogen base without amino acids*

2% (w/v) Agar (nur für Festplatten)

2% (v/v) 10x *Dropout solution* mit den jeweils benötigten Aminosäuren

pH 5,8 einstellen, autoklavieren, auf 50°C abkühlen und

2% (v/v) autoklavierte Glukoselösung dazugeben

Dropout solution (DO) (10 x)

0,62% (w/v) SD/-Trp/-Leu/-His,

0,64% (w/v) SD/-Trp/-Leu,

0,69% (w/v) SD/-Leu oder

0,74% (w/v) SD/-Trp

2.2.4 Transformation von Hefen**Elektroporation**

Soll nur ein Plasmid in die Hefezelle transformiert werden, stellt die Elektroporation eine gute Methode dar. Für die Kotransformation von zwei Plasmiden ist die Methode jedoch weniger geeignet, da nur wenige Zellen beide Plasmide aufnehmen. Wie auch bei den Bakterienzellen öffnet ein Spannungsimpuls die Poren in der Plasmamembran, so dass DNA aus dem umgebenden Medium ins Zytoplasma gelangen kann. Die Transformationseffizienz liegt für ein Plasmid bei 1×10^4 bis 1×10^5 cfu/ μg DNA.

Herstellung kompetenter Hefen

Eine 500 ml YPD-Hefekultur wird bei 30°C bis zu $\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 1,3-1,5$ inkubiert und anschließend 5 min bei 4000 g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wird in 500 ml sterilem eiskaltem ddH₂O resuspendiert und erneut 5 min bei 4000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird mit 250 ml sterilem ddH₂O (4°C) und mit 20 ml einer 1 M Sorbitol-Lösung (4°C) gewaschen. Anschließend wird das Pellet in 0,5 ml 1 M Sorbitol-Lösung (4°C) resuspendiert. Die Zellen sind maximal 3 Tage bei -80°C haltbar, sollten möglichst frisch eingesetzt werden. Puffer und Lösungen für die Herstellung kompetenter Hefen sind am Ende dieses Kapitels zu finden.

Durchführung

Ein Gemisch aus 65 μl frisch präparierten kompetenten Zellen und maximal 4 μl Plasmid-DNA (0,5-3,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wird 5 min lang auf Eis inkubiert, in eine eisgekühlte Küvette überführt und für etwa 4 ms einem Spannungsimpuls von 750 V ausgesetzt. Anschließend werden die Zellen in 1 ml 1 M Sorbitol-Lösung aufgenommen und auf Agarplatten mit einem Sorbitolgehalt von 1 M ausplattiert.

Chemische Transformation von Hefezellen

Die Effizienz bei der chemischen Transformation von Hefezellen liegt im Bereich von etwa 1×10^3 cfu/ μg DNA. Im Gegensatz zur Elektroporation lassen sich mit dieser Methode auch zwei Plasmide gleichzeitig transformieren.

Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen werden 50 ml YPD- beziehungsweise SD-Medium (siehe 2.2.3) mit einer Hefekolonie angeimpft, die Zellen circa 18 Stunden lang bei 30°C bis zu einer Zelldichte von $\text{OD}_{600 \text{ nm}} > 1,5$ inkubiert und die Vorkultur in 300 ml frisches Medium überimpft. Inkubation erfolgt im Schüttelwasserbad bei 30°C bis zu einer Zelldichte von $\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0,5$ (etwa 3 Stunden). Die Kultur wird für 5 min bei 1000 g und Raumtemperatur zentrifugiert und das Pellet in 25 ml sterilem ddH₂O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 1000 g wird das Pellet in 1,5 ml frisch hergestellter 1x TE/LiAc-Lösung aufgenommen. Die hergestellten Zellen sind nur für etwa eine Stunde kompetent und müssen daher sofort eingesetzt werden. Puffer und Lösungen für die Herstellung kompetenter Hefen sind am Ende dieses Kapitels zu finden.

Durchführung

0,1 ml der Zellen werden mit 0,1 μg Köderkonstrukt und 30 μg Bibliothekskonstrukt in 10 ml frisch hergestellter PEG/LiAc-Lösung vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 30°C werden unter ständigem Schütteln 70 μl DMSO zugegeben. Es folgt ein Hitzeschock bei 42°C für 15 min. Die Zellen werden 1-2 min auf Eis gekühlt und 5 min bei 1000 g zentrifugiert. Das Pellet wird in 0,5 ml TE aufgenommen und auf entsprechende Selektionsmedien ausplattiert.

Puffer und Lösungen für die Hefetransformation

TE-Puffer (10x)

100 mM Tris/HCl, pH 7,5

10 mM EDTA

autoklavieren

Lithiumacetat (10x)

1 M Lithiumacetat

pH 7,5 einstellen, autoklavieren

PEG/LiAc-Lösung

40% (w/v) Polyethylenglycol 6000

1 x TE

1 x Lithiumacetat

carrierDNA

10 mg/ml Heringssperma *carrierDNA*

bei 100°C für 20 min erhitzen und auf Eis abschrecken

2.2.5 Isolierung von Plasmid DNA aus *Sacharomyces cerevisiae*

Die Isolierung von Plasmiden aus Hefezellen wurde nach Vorschrift der Firma Clontech durchgeführt, sie folgt zum Großteil der Methode von Ling *et al.* (Ling *et al.*, 1995).

Die zu präparierende Hefekolonie wird auf das entsprechende SD-Festmedium ausgestrichen und 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend entnimmt man etwa 1 cm² des Zellrasens und resuspendiert ihn in 50 µl TE-Puffer.

Die Suspension wird mit 50 U Lytikase für 60 min bei 37°C inkubiert, um die Zellen enzymatisch aufzuschließen. Die aufgeschlossenen Hefe-Zellen werden mit 10 µl einer 20%igen SDS-Lösung versetzt und 1 min geschüttelt. Nun wird die Suspension bei -80°C eingefroren, um die Zellen vollständig aufzuschließen. Nach dem Auftauen wird die Suspension auf eine CHROMA SPIN-1000-Säule (Clontech) gegeben, die vorher mit DEPC-H₂O äquilibriert wurde und die Suspension bei 700 g 5 min zentrifugiert. Proteine, RNA und ein Teil der genomischen Hefe-DNA werden hierbei von der Plasmid-DNA abgetrennt. Im Eluat befindet sich ein Gemisch aus Plasmid- und genomischer DNA.

Zur Gewinnung reinerer Plasmid-DNA ist es notwendig, *E.coli*-Bakterien (HB101) mit einem Aliquot des Eluats durch Elektroporation zu transformieren. Der Transformationsansatz wird auf Selektionsplatten über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend nach der Methode der Minipräparation (siehe 2.5.1) weiterverarbeitet.

Puffer und Lösungen für Plasmid-DNA-Präparationen aus Hefen

Lytikase/Sorbitol-Lösung

1,2 M	Sorbitol
0,1 M	Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4
5 U/ μ l	Lytikase

2.2.6 β -Galaktosidase-*colony-lift*-Filter-assay

Die auf dem Mangelmedium gewachsenen Kolonien sollten β -Galaktosidase produzieren, um dies zu testen werden sie auf frische Selektionsplatten überimpft und 4 bis 5 Tage bei 30°C inkubiert. Ein Papierfilter (Whatman #5, \varnothing 75 mm) wird auf die Kolonien gelegt, und die Kolonien von der Agarplatte abgehoben. Der Filter mit den Kolonien wird für zehn Sekunden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Filter mit den lysierten Zellen wird nach dem auftauen in eine Petrischale gelegt, in der sich ein mit X-Gal/Z-Puffer-Lösung getränkter Nitrozellulosefilter liegt. Die Petrischale wird bei 30°C inkubiert. Nach 1-8 Stunden sollte sich eine Blaufärbung der Kolonien zeigen.

Puffer und Lösungen für β -Galaktosidase-*colony-lift*-Filter-assay

Z-Puffer

60 mM	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
40 mM	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
10 mM	KCl
1 mM	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

pH 7,0 einstellen, autoklavieren

X-Gal-Lösung

20 mg/ml X-Gal in DMF lösen
im Dunkeln lagern

Z-Puffer/X-Gal-Lösung

98% (v/v)	Z-Puffer
0,26% (v/v)	β -Mercaptoethanol
1,64% (v/v)	X-Gal-Lösung

2.3 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen

2.3.1 Medien für die Zellkultur

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (High Glukose) (Gibco/PAA)

(Dulbecco *et al.*, 1959)

D-Glukose 4500 mg/l

mit Natriumpyruvat

ohne L-Glutamin

Lagerung bei 4°C

Vor Gebrauch werden dem Medium je 5 ml Penicillin/Streptomycin- und 100 x L-Glutamin-Lösung pro 500 ml Medium zugesetzt. Außerdem werden 50 ml dekomplementiertes FCS (*Fetal calf serum*) hinzugeben.

RPMI: Medium (Biochrom KG)

NaHCO₃ 2,0 g/l

N-Acteyl-L-Alanyl-L-Glutamin 0,532 g/l

Lagerung bei 4°C

Vor Gebrauch werden dem Medium je 5 ml Penicillin/Streptomycin- und 100 x L-Glutaminlösung pro 500 ml Medium zugesetzt. Außerdem werden 50 ml dekomplementiertes FCS hinzugeben.

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

Das FCS muss vor der Verwendung dekomplementiert werden. Dies geschieht durch Erhitzen für 30 min auf 54°C. Anschließend wird es in 50 ml-Portionen aliquotiert und kann bei 20°C gelagert werden.

Puffer und Lösungen für die Zellkultur

PBS: *Phosphat Buffered Saline*, steril (GIBCO)

2,7 mM KCl

0,14 mM NaCl

1,5 mM KH₂PO₄

8,1 mM Na₂HPO₄

pH 7,2

Penicillin/Streptomycin-Lösung (Sigma)

100 U/ml Penicillin

10 mg/ml Streptomycin

in 0,9%iger steriler NaCl-Lösung

Die Lösung wird zu je 5 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Trypsin/EDTA-Lösung, 10x (Sigma)

5 g/l Trypsin

2 g/l EDTA

in 0,9%iger steriler NaCl-Lösung

Nach der 1:10 Verdünnung mit sterilem PBS wird die Lösung zu je 15 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

L-Glutamin-Lösung, 100x (Gibco)

200 mM L-Glutamin

steril

Die Lösung wird zu je 5 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.3.2 Arbeiten in der Zellkultur

Die Arbeiten der eukaryontischen Zellkultur werden unter der Sterilwerkbank BSB 6A der Firma Gelaire Flow Laboratories durchgeführt. Für die Inkubation der Zellen wird der Brutschrank BB16 der Firma Heraeus verwendet. Die Inkubation erfolgt bei 37°C und 5% CO₂. Für die Zelllinien HEK 293, TSA 3pG und Cos 7 wurden Zellkulturflaschen mit 80 cm² Grundfläche der Firma Nunc verwendet. Die Inkubation der Zelllinien U937 und HEL erfolgt in Zellkulturflaschen der Firma Greiner mit 80 beziehungsweise 25 cm² Grundfläche. Außerdem werden Zellkultur-Petrischalen mit 60 oder 100 mm der Firma Nunc und 6 beziehungsweise 96 well-Platten der Firma Dynatech verwendet. Zum Pipettieren werden steril verpackte Plastik-Einmalpipetten eingesetzt.

Die Medien und das PBS werden vor jeder Benutzung im Wasserbad auf 37°C aufgewärmt.

2.3.2.1 Passagieren von Zellen

Adhärenz wachsende Zellen

Um die Zellen in Kultur zu erhalten, müssen sie in regelmäßigen Abständen passagiert werden. Dies sollte geschehen, bevor die Zellen vollständig konfluent gewachsen sind, da ansonsten apoptotische Prozesse stattfinden und die Zellen die exponentielle Wachstumsphase verlassen. Die verwendeten adhärenz wachsenden Zelllinien werden bei 80-90% Bedeckung passagiert. Zellen, die dichter gewachsen sind oder gerade aufgetaut wurden, müssen eine Woche wachsen und die exponentielle Wachstumsphase erreichen, bevor sie für ein Luciferase-Assay eingesetzt werden können.

Das Passagieren der adhärenz Zellen erfolgt wie folgt:

- Kulturflaschen mit Zellen aus dem Brutschrank nehmen und im Mikroskop den Zellrasen überprüfen. Dabei sollten die Zellen zu 80-90% dicht gewachsen sein.
- Unter der Sterilwerkbank das Medium über die Oberkante abgießen.
- Zellen mit 10 ml PBS waschen. Dabei sollte vorsichtig pipettiert werden, da sich sonst leicht Zellen vom Flaschenboden ablösen. Dies gilt vor allem für die HEK 293 und Tsa 3pG Zellen.
- Das PBS mit der Pipette vorsichtig abnehmen oder abgießen
- 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugeben und Kulturflasche schwenken, so dass der gesamte Zellrasen von der Flüssigkeit bedeckt wird.
- Nach ungefähr 30 Sekunden (HEK 293 und TSA 3pG) bis einige min (Cos 7) werden die Zellen durch leichtes Klopfen gegen die Handkante abgelöst. Zu langes Einwirken der Trypsin/EDTA-Lösung führt hierbei zum Absterben der Zellen. Anschließend werden 8 ml Kulturmedium zugeben.
- Nun wird mit der 10 ml Pipette resuspendiert.
- 1 ml der Zellsuspension wird in eine neue Kulturflasche überführt und mit 20 ml Kulturmedium aufgefüllt. Falls kürzere Abstände beim Passagieren gewünscht sind, kann entsprechend mehr Zellsuspension eingesetzt werden.
- Die Zellkulturflaschen werden bei 37°C und 5% CO₂ 2-3 Tage inkubiert.

Passagieren von Suspensionszellen

Auch in Suspension wachsende Zellen müssen regelmäßig verdünnt werden. Die Dichte der Zellen kann jedoch im Lichtmikroskop nicht gut ermittelt werden. Die Farbe des Kulturmediums gibt Hinweise auf die Dichte der Zellen. Wenn sich die Farbe des Mediums von rot zu hellrot oder gelb ändert, sollte unbedingt passagiert werden. Bei den Suspensionszellen entfällt der Schritt des Ablösens von der Zellkulturflasche. Zum Passagieren werden 1,3 ml der Suspensionszellen aus der Flasche entnommen und in einer neuen Zellkulturflasche mit 18,7 ml frischem Medium vermischt. Die Flaschen werden bei 37°C und 5% CO₂ 2-3 Tage inkubiert.

2.3.2.2 Lagerung von eukaryontischen Zellen

Für reproduzierbare Ergebnisse ist der Zustand der Zellen von entscheidender Bedeutung. Da häufiges Passagieren der Zellen jedoch zu Veränderungen der Morphologie und des Wachstums führen kann, ist es notwendig die Zellen über längere Zeiträume zu lagern. Auch lässt sich eine Kontamination der Zellkultur durch Viren, Bakterien oder Pilze nie vollständig ausschließen.

Daher ist es sinnvoll, immer einen ausreichend großen Vorrat an Aliquots der Zelllinien zu lagern, um stets auf frische, nicht Verunreinigte Zellen zurückgreifen zu können.

Die Lagerung der Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff. Damit die Zellen diese extremen Bedingungen überleben, ist eine spezielle Behandlung erforderlich.

Einfrieren der Zellen

Um eine genügend große Anzahl an Zellen zu erhalten, werden die Zellen passagiert und in vier 80 cm² große Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellen werden bis zu einer Zellzahl von ungefähr 1×10^7 Zellen/Flasche inkubiert. Dann werden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA abgelöst (vergleiche 2.3.2) und mit 8 ml Medium versetzt. Die viermal 10 ml Zellsuspension werden in einem sterilen Falcon-Gefäß vereinigt und bei 15 x g bei 4°C für 30 min zentrifugiert. Das Medium wird mit der Pipette vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 5,4 ml kaltem, sterilem FCS sorgfältig resuspendiert. Anschließend werden 600 µl (10% v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben. Das DMSO sollte auf Eis vorgekühlt werden, damit es von den Zellen

besser aufgenommen wird. Die Zellsuspension wird auf 6 Cryoröhrchen verteilt. Alle Arbeitsschritte nach der Zentrifugation werden auf Eis durchgeführt. Die Cryoröhrchen werden anschließend in einer doppelwandigen Styroporbox im Tiefkühlschrank langsam auf -80°C gekühlt und nach zwei bis drei Tagen in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Kontrolle der Prozedur sollte nach etwa 2 Tagen ein Cryoröhrchen aufgetaut werden und das Wachstum für mindestens 1 Woche beobachtet werden.

Auftauen der Zellen

Die Zellen werden direkt nach der Entnahme des Cryoröhrchens aus dem Stickstoff oder aus dem Tiefkühlschrank möglichst schnell aufgetaut. Die Zellsuspension wird in ein steriles Falcon-Gefäß überführt, in dem 20 ml kaltes Medium vorgelegt sind, und gut durchmischt. Die Zellsuspension wird für 30 min bei $15 \times g$ und 4°C zentrifugiert und das Medium mit der Pipette abgenommen. Das Pellet wird in 20ml kaltem Medium aufgenommen, resuspendiert und in eine 80 cm^2 Zellkulturflasche pipettiert. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank. Nach ein bis zwei Tagen können die Zellen passagiert werden. Bevor mit den Zellen gearbeitet werden kann, müssen sie für mindestens 3 Passagen beobachtet werden, um auszuschließen, dass sie durch die Prozedur des Einfrierens Schäden davongetragen haben.

2.3.2.3 Ermittlung der Zellzahl mit dem Hämocytometer

Das Hämocytometer (auch Neubauer-Kammer) bietet eine schnelle Möglichkeit zur Bestimmung der Zellzahl in einer Probe. Die Zählkammer besteht aus einem Objektträger, auf dem ein Gitternetz eingraviert ist und einem Deckglas. Das Deckglas liegt nicht direkt auf dem Objektträger auf, sondern in einem Abstand von 0,1 mm, da die Ränder des Objektträgers leicht erhöht sind. So wird zwischen den beiden Glasplättchen ein definiertes Volumen eingeschlossen. Der richtige Sitz des Deckgläschens lässt sich an dem Auftreten von *Newtonschen Ringen* erkennen, die sich an den Rändern bilden. Bei Befüllen der Kammer ist darauf zu achten, dass die Kammer nicht über- oder unterfüllt wird, da dies das Zählergebnis verfälschen kann. Das Gitternetz besteht aus 9 Großquadraten, von denen jedes eine Fläche von 1 mm^2 hat. Bei einer Tiefe von 0,1 mm ergibt sich für jedes Großquadrat ein Volumen

von 0,1 mm³ oder 0,1 µl. Es sollten mindestens 4 Großquadrate ausgezählt werden, um Schwankungen in der Dichte auszuschließen. Um die lebenden und toten Zellen unterscheiden zu können, kann eine Trypanblaufärbung durchgeführt werden. Die lebenden Zellen transportieren durch Diffusion in die Zellen gelangtes Trypanblau aktiv wieder nach außen, tote Zellen sind dazu nicht in der Lage und erscheinen blau.

Die Zellzahl ergibt sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellen/ml} = (\sum 4\text{Großquadrate}/4) \cdot 10^4 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.3.3 Transiente Transfektionen

2.3.3.1 Kalziumphosphat-Methode

Bei der Kalziumphosphat-Methode werden die Zellen am 1. Tag der Transfektion in einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen/60 mm Platte ausgesät. Am 2. Tag werden die Zellen einmal mit 1 x Hebes-Puffer gewaschen, anschließend werden 4 ml Kulturmedium auf die Platten gegeben und die Zellen werden für mindestens 2 Stunden in den Brutschrank gestellt. 10 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA wird in sterile Rundbodenröhrchen vorgelegt und mit 200µl 2 x Hebes-Puffer gemischt. Nun wird 2,5 M CaCl₂-Lösung 1:10 mit sterilem Wasser verdünnt und sofort 200 µl dieser Lösung zu dem DNA-Hebes-Gemisch zugetropft. Das Gemisch wird einmal auf- und abpipettiert und auf die Zellen gegeben. Nach 4 Stunden im Brutschrank werden die Zellen zweimal mit Hebes-Puffer gewaschen und in 5 ml Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen können nach 36-48 Stunden geerntet werden.

Medien für die Kalziumphosphat-Transfektion

10 x Hebes

67 mM KCl

1,42 M NaCl

100 mM Hebes

pH 7,3 einstellen, mit H₂O ad 1000 ml

für die Herstellung von 1 x Hebes 1:10 mit H₂O verdünnen und autoklavieren.

CaCl₂-Lösung

2,5 M CaCl₂

sterilfiltrieren, bei -20°C lagern

10 x Hebs

1,37 M NaCl

0,21 M Hepes

48 mM KCl

7,5 mM Na₂HPO₄

für die Herstellung von 2 x Hebs mit H₂O verdünnen und pH-Wert 7,1 einstellen, sterilfiltrieren.

2.3.3.2 Effectene/Superfect

Das von der Firma Qiagen angebotene *Effectene*TM-Transfektionsverfahren benötigt weniger DNA, ist für die Zellen schonender und weniger zeitaufwendig. Bei dem *Effectene*-Reagenz handelt es sich um ein nicht-liposomales Lipid-Transfektionsreagenz. Es wird in Verbindung mit dem *Enhancer* und einem DNA-Kondensationspuffer eingesetzt. Die Zugabe des *Enhancers* dient der Kondensation der DNA. Die geschieht durch eine Wechselwirkung der positiv geladenen *Enhancer*-Moleküle mit dem Phosphatrückgrat der DNA. Das *Effectene*TM erzeugt im nächsten Schritt eine Micellenstruktur und umschließt die kondensierte DNA. Durch Endozytose werden die so gebildeten Komplexe in die Zellen aufgenommen.

Die Transfektionen werden in 100 mm Schalen, 60 mm Schalen oder 6 well Platten durchgeführt, wobei die eingesetzte DNA-Menge der im Qiagen Transfektionshandbuch angegebenen Menge entspricht. In den Transfektionen werden für alle Plasmide Stammlösungen von 100 ng/μl eingesetzt. Falls mehrere Plasmide in einem Transfektionsansatz zum Einsatz kommen, werden sie zu gleichen Gewichtsanteilen zugesetzt.

Für die Transfektion werden am Vortag in den 100 mm Schalen 1 x 10⁶ Zellen, in den 60 mm Schalen 3 x 10⁵ Zellen und in den 6 well Platten 1 x 10⁵ Zellen ausgesät. Am Tag der Transfektion sollte die Konfluenz der Zellen bei ungefähr 30% liegen.

Die Transfektion erfolgt dabei nach dem Transfektionshandbuch der Firma Qiagen Protokoll *Transient Transfection of Adherent Cells*, wobei die Mengen für das *Effectene* wie folgt verändert wurden (siehe Tabelle 3):

Tabelle 3: Eingesetztes Effectene bei den Transfektionen

	<i>Menge Effectene [μl]</i>
100 mm Schale	40
60 mm Schale	20
6 well Platte	10

Die Transfektionsmischung kann bis zu 24 Stunden auf den Zellen gelassen werden, bevor die Zellen mit PBS gewaschen und das Medium gewechselt wird. Die Ernte erfolgt nach 48 Stunden.

Um höhere Transfektionseffizienzen zu erreichen, kann mit dem *Superfect*-Reagenz gearbeitet werden. Die eingesetzten DNA-Mengen und Zellzahlen entsprechen dabei denen des *Effectene*-Protokolls. Die Transfektion erfolgt nach dem *Superfect*-Transfektionshandbuch der Firma Qiagen. Da die Cytotoxizität des *Superfect*-Reagens sehr hoch ist, wird es spätestens 3 Stunden nach der Transfektion abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Kulturmedium zugegeben. Nach 24 Stunden wird das Medium erneut gewechselt. Die Ernte erfolgt nach 48 Stunden.

2.3.3.3 Elektroporation

Ein weiteres Verfahren zur Transfektion von Zellen ist die Elektroporation. Der Vorteil dieser Methode liegt in der höheren Transfektionseffizienz im Vergleich zu Kalziumphosphat und *Effectene*.

Für die Elektroporation wird ein Elektroporator der Firma *Eppendorf* und der Elektroporator EP 251 verwendet.

Am Vortag der Elektroporation werden die Zellen gesplittet und auf etwa 10^5 /ml eingestellt. Am darauf folgenden Tag werden die Zellen einmal mit Kulturmedium ohne FCS gewaschen und eine Konzentration von $2,8 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt. Für jeden Ansatz wird 0,5 ml der Zellsuspension eingesetzt. Je 20 μg des zu

transfizierenden Plasmids werden lyophilisiert und in 50 µl Kulturmedium ohne FCS oder *Hypoosmolar Electroporation Buffer* der Firma Eppendorf aufgenommen. Nach Zugabe der Plasmid-DNA in die Küvette (Firma Eppendorf) werden die Zellen 5 min bei RT inkubiert und anschließend für 5 min auf Eis gestellt. Die Elektroporation erfolgt bei 260 V und 960 µF. Anschließend erfolgt eine 15 minütige Inkubation auf Eis. Nach dieser Zeit werden die Zellen in 5ml Kulturmedium mit FCS aufgenommen und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.3.4 Ernten von Zellen

2.3.4.1 Ernten für β-Galaktosidase- und Luziferase-Assay

Nach 48 Stunden werden die transfizierten Zellen geerntet. Die Zellen sollten zu diesem Zeitpunkt zu 90-100% dicht gewachsen sein.

Zunächst wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Für die 60 mm Schalen werden 300 µl, für die 6 well Platten 200 µl Extraktionspuffer zugegeben. Anschließend wird für 10 min bei RT inkubiert. Das Zelllysat wird mit einem Zellkulturschaber sorgfältig gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und bei 13.000 rpm 2 min (RT) zentrifugiert. Der Überstand wird in neue Reaktionsgefäß überführt und kann direkt für die Messungen eingesetzt oder bei -70°C gelagert werden.

Lösungen zum Ernten der Zellen

Extraktionspuffer

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

Lagerung erfolgt bei RT. Vor Gebrauch werden 100 µl 1 M DTT-Lösung je 10 ml Puffer zugesetzt.

2.3.4.2 Ernten für Proteinaufarbeitung/Zellkernextraktion

Für die Gewinnung der Proteine oder Zellkernextraktionen werden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml PBS und einer 1 ml Pipette gelöst. Die Sedimentation der Zellen erfolgt bei 1000 g in einer Tischzentrifuge. Die Zellen müssen direkt weiterverarbeitet werden. Suspensionszellen wurden in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt und zweimal bei 300g und 4°C mit 50 ml PBS gewaschen.

2.3.5 Reportergeren-Assays

2.3.5.1 β -Galaktosidase-Assay

Die Reaktion mit β -Galaktosidase dient der Normierung der Signalstärken auf die Transfektionseffizienz beim Luziferase-Reportergerenassay. Bei dieser Normierung wird davon ausgegangen, dass die Transfektionseffizienz des β -Galaktosidase-Plasmids proportional zur Transfektionseffizienz der anderen Konstrukte ist. Durch Quantifizierung der β -Galaktosidase-Aktivität und damit der exprimierten β -Galaktosidase erhält man die Basis für die Berechnung der normierten Reportergerenaktivität. Der Nachweis der β -Galaktosidase erfolgt mittels der Hydrolyse von o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG) zu dem gelben Farbstoff o-Nitrophenyl.

Für das Assay werden 360 μ l Z-Puffer, 40 μ l Zelllysat und 100 μ l ONPG-Lösung bei 37°C in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen inkubiert, bis eine deutliche Gelbfärbung zu erkennen ist. Durch Zugabe von 250 μ l Na₂CO₃-Lösung wird die Reaktion beendet, wobei darauf zu achten ist, dass die Zugabe der Carbonat-Lösung in der gleichen Reihenfolge erfolgt wie die ONPG-Zugabe, damit alle Proben die gleiche Reaktionszeit haben. In einer Mikrotiterplatte werden 100 μ l von jedem Ansatz gegen Z-Puffer im *ELISA-Reader* EL309 gemessen. Der β -Galaktosidase-Assay wird als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Inkubationszeiten bis zur sichtbaren Gelbfärbung variieren je nach Transfektionseffizienz von wenigen Sekunden bis zu mehreren min.

Puffer und Lösungen für das β -Galaktosidase-Assay

Z-Puffer

30 mM	Na_2HPO_4
40 mM	NaH_2PO_4
10 mM	KCl
1 mM	MgSO_4

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

ONPG-Lösung

4 mg/ml o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyrosid (Sigma) in ddH₂O. Die Lösung kann in 1 ml Aliquots bei -20°C gelagert werden.

Na_2CO_3 -Lösung

1 M Na_2CO_3 in ddH₂O. Die Lösung kann bei RT gelagert werden.

2.3.5.2 Luziferase-Assay

Luziferase kommt in der Natur zum Beispiel in Glühwürmchen, Leuchtkäfern (*firefly*) oder Leuchtbakterien (bakterielle Luziferase) vor. Es kann im *in vitro* System als Markerprotein eingesetzt werden. Der Luziferase-Assay beruht auf der von der *firefly*-Luziferase, einer Monooxygenase, katalysierten Reaktion in der Luziferin unter ATP-Verbrauch zu einem reaktiven Zwischenprodukt oxidiert wird. Dieses relaxiert durch Emission von Licht bei 508 nm in seinen Grundzustand Oxyluziferin. Die entstehende Chemolumineszenz wird in Lumineszenzmeßgeräten detektiert und ist proportional zu der im Zelllysat enthaltenen Luziferasemenge. Diese ist abhängig von der Aktivierung des Luziferasegens und den regulatorischen Prozessen am vorgeschalteten Promotor.

Für die Messung der Lumineszenz wird ein Röhrcchenlumat der Firma Beckman verwendet. 300 μl Messpuffer werden in 5 ml Sarstedt-Röhrcchen vorgelegt und direkt vor der Messung mit 50 μl Lysat versetzt. Das Röhrcchen wird in den Lumaten gestellt, der selbständig 100 μl Luziferinlösung injiziert und für 10 Sekunden die Lumineszenz detektiert. Um Schwankungen zwischen den Messungen auszugleichen, werden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Messungen werden mittels der β -Galaktosidase-Messwerte normiert.

Puffer und Lösungen für das Luziferase-Assay

ATP-Lösung

100 mM ATP
0,2 M Tris-Base (nicht eingestellt)
aufbewahren bei -20°C

Luziferin-Stammlösung

25 mM Luziferin in 25 mM NaOH
500 ml Aliquots bei -20 °C aufbewahren, vor Gebrauch 1:100 mit Messpuffer (ohne ATP) verdünnen.

Messpuffer

25 mM Glycylglycin
15 mM MgSO₄
vor Gebrauch 5 mM ATP zugeben.

2.3.6 GFP-Quantifizierung

Anstelle der Normierung mittels des β -Galaktosidase-Assays, kann auch in den 6 *well* Platten auch mit GFP normiert werden. Dazu wird anteilig zu den Transfektionsansätzen das Plasmid pEGFP transfiziert. Diese werden am Tag der Ernte im Gerät bei einer Excitation von 485 gemessen und die Emission bei 527 nm bestimmt.

2.3.7 Fluoreszenzmikroskopie

Die Expression von EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) und RFP (*red fluorescent protein*) als Fusionsproteine, ermöglicht die Lokalisation zu untersuchender Proteine in der Zelle. Für die Betrachtung der Zellen wurde ein Mikroskop der Firma Leica (Typ DM IRBE) verwendet. Wird EGFP bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, kann die Emission bei 507 nm beobachtet werden. RFP wird mit Licht der Wellenlänge 558 nm angeregt und hat ein Emissionsmaximum bei 583 nm.

Kultivierung und Transfektion der Zellen

Für die Fluoreszenzmikroskopie müssen die Zellen adhärent auf einem Deckglas wachsen. Vor dem Einsatz in der Zellkultur werden die Deckgläser (Größe 20 x 20 mm) mit 70% Ethanol und ddH₂O gewaschen und autoklaviert. Die Transfektionen werden in 60 mm Petrischalen durchgeführt. In jede Schale wird ein autoklaviertes Deckglas gelegt. Für die Fluoreszenzmikroskopie sollten die Zellen geringere Dichten aufweisen als in den Reporterassays. Üblicherweise werden zwischen 1 bis 2 x 10⁵ Zellen in 5 ml Medium transfiziert. Die Transfektion der Zellen erfolgt wie unter 2.3.3 beschrieben. Ungefähr 24 Stunden nach der Transfektion, sollte sich in den Zellen fluoreszierendes Protein nachweisen lassen. Nach 48 Stunden Wachstum, werden die Zellen für die Mikroskopie fixiert.

Fixieren der Zellen

Um die Zellen besser mikroskopieren zu können und sie länger haltbar zu machen, werden die Zellen auf dem Deckglas fixiert. Da hierbei Strukturen zerstört oder verfälscht werden können, werden parallel unterschiedliche Fixier-Methoden eingesetzt.

A: Fixierung mit para-Formaldehyd

Die mit den Zellen bewachsenen Deckgläser werden in Glas-Petrischalen überführt und 2 x mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wird 3% para-Formaldehyd in PBS aufgetropft und die Zellen für 30 min bei RT inkubiert und 3 x mit 5 ml PBS gewaschen. Verbliebenes PBS wird vorsichtig mit einem Papiertuch abgenommen. Auf ein Deckglas wird ein Tropfen Gelvatol gegeben und das Deckglas mit den Zellen nach unten aufgelegt. Nach 24 Stunden Inkubation bei RT können die Zellen mikroskopiert werden. Bei 4°C sind die Proben mehrere Wochen haltbar.

B: Fixierung mit Aceton/Methanol

Die mit den Zellen bewachsenen Deckgläser werden in Glas-Petrischalen überführt und 2 x mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend werden 3 ml Methanol aufgegeben und die Zellen für 15 min bei -20°C inkubiert. Das Methanol wird abgenommen und 3 ml eiskaltes Aceton zupipettiert. Nach 5 min bei -20°C wird 3 x mit 5 ml PBS gewaschen. Verbliebenes PBS wird vorsichtig mit einem Papiertuch abgenommen.

Auf ein Deckglas wird ein Tropfen Gelvatol gegeben und das Deckglas, mit den Zellen nach unten, aufgelegt. Nach 24 Stunden Inkubation bei RT, können die Zellen mikroskopiert werden. Bei 4°C sind die Proben mehrere Wochen haltbar.

Lösungen für die Fixierung

20 g Gelvatol

lösen in 80 ml

0,14 M NaCl

0,01 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NA}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, pH7,2

anschließend

40 ml Glycerol

25 mg/ml 1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan

zugeben, aufbewahren bei -20°C

2.3.8 Verwendete Plasmide in der Zellkultur

pcDNA1.1 und pcDNA1.1/Amp

Bei diesen Plasmiden handelt es sich um Expressionsvektoren für Säugetierzellen der Firma Invitrogen. Der Vektor trägt den CMV-Promotor für die Funktion in eukaryontischen Zellen. Nach der MCS folgt ein SV40 Polyadenylierungssignal. Der Vektor trägt einen SV40-Ori, um die Replikation in Säugetierzellen mit SV40 T-Antigen zu ermöglichen. Der Replikationsursprung in Bakterien ist Col E1.

In die MCS von pcDNA1.1Amp wurden die Gene für die Transkriptionsfaktoren CEBP, ETS2, Fog, c-Fos, GATA-1 und c-Jun kloniert.

pEGFP-C2, -C3

Der von der Firma *Clontech* bezogene 4,7 kBp große pEGFP-Vektor ist in drei verschiedenen Leserastern erhältlich und dient der Expression von *enhanced green fluorescent protein* (EGFP)-Fusionsproteinen. Der Vektor kodiert eine optimierte Variante des Wildtyp-GFP, die sich durch eine höhere Expressionsrate und stärkere Fluoreszenz in eukaryontischen Zelllinien auszeichnet (Clontech, 1998). Sein Excitationsmaximum liegt bei 488 nm, sein Emissionsmaximum bei 507 nm. Die kodierende Sequenz des EGFP-Gens wird durch den *cytomegalovirus*-Promotor

(CMV) kontrolliert und wurde der menschlichen *codon-usage* angepasst. Die MCS befindet sich zwischen dem C-Terminus von EGFP und dem SV40-Polyadenylierungssignal. In die MCS klonierte Gene werden als C-terminaler Fusionsanteil exprimiert. Durch SV40-Polyadenylierungssignale des EGFP-Gens wird die Prozessierung des 3'-Endes der EGFP-mRNA kontrolliert. Ein SV40-Promotor, eine Neomycin/Kanamycin-Resistenzgen (TN5) und Polyadenylierungssignale des *Herpes simplex* Virus-Thymidinkinase-Gens (HSV TK) bilden ein Gen-*cluster*, durch den die Selektion transfizierter eukaryontischer Zellen auf neomycinhaltigem Medium möglich ist. Durch einen, vor dieser Sequenz (stromaufwärts) gelegenen, bakteriellen Promotor wird das Kanamycinresistenzgen in *E.coli*-Zellen transkribiert. Ein pUC-Replikationsursprung sorgt für Vermehrung in *E.coli*. Ein f_1 -Ursprung ermöglicht die Produktion einzelsträngiger DNA in Bakterienzellen, welche F-Plasmide enthalten.

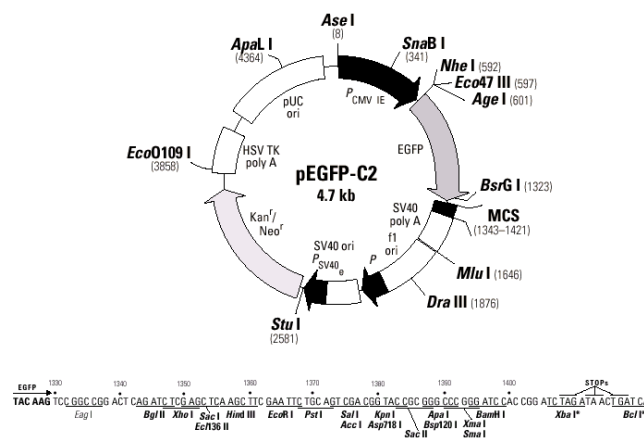


Abbildung 15: Abbildung der GFP-Vektoren

pDsRed1-N1

Der pDsRed1-Vektor kodiert ein Rot fluoreszierendes Protein (RFP) mit einem Excitationsmaximum bei 558 nm und einem Emissionsmaximum bei 583 nm (Matz *et al.*, 1999). Das RFP stammt aus der See-Anemone *Discosoma sp.* Das Plasmid trägt einen CMV-Promotor vor der MCS, um die Transkription in eukaryontischen Zellen zu gewährleisten. Der Vektor ermöglicht die Expression von N-terminalen Fusionsproteinen an RFP. Der Vektor trägt eine Kanamycin-Resistenz für *E.coli* und eine Neomycin-Resistenz für eukaryontische Zellen. Zusätzlich ist ein pUC Origin für die Replikation in *E.coli* vorhanden.

pTal-Luc

pTal-Luc ist ein Vektor aus dem Mercury-System der Firma Clontech. Der Vektor besitzt eine TATA-Box aus dem *Herpes simplex Virus* (p_{Tal}) und das Luziferase-Gen (*luc*) aus *Photinus pyralis*. 3' vom Luziferase-Gen folgt das Polyadenylierungssignal aus dem SV40. Vor der MCS sitzt ein Oligodesoxynukleotid, das die Transkription blockiert (TB). Darüber hinaus besitzt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion, einen f_1 -Origin und dem bakteriellen pUC-Replikations-*origin*. Dieser Vektor kann benutzt werden, um die Wirkung verschiedener *Enhancer* (Verstärker) in der MCS zu untersuchen. Durch Einklonierung einer 400 Bp großen Sequenz des *rcd*-Promotors wurde das Plasmid *prcd-Luc* erhalten.

pmim-1-Luc

pmim-1-Luc ist ein Reporterengenkonstrukt. Es besitzt ein Luziferasegen unter der Kontrolle einer *mim-1* Promotorregion. Das Plasmid besitzt für die Replikation in *E.coli* ein Ampicillinresistenzgen.

pCMV-CBP

Dieses Plasmid dient als Expressionsvektor für den Transkriptionsfaktor CBP. Es trägt als Selektionsmarker eine Amp-Resistenz.

pCMV-E2F-1

Dieser Vektor ist aus dem Vektor pRc/CMV hervorgegangen dient als Expressionsvektor für den Transkriptionsfaktor E2F-1. Er trägt als Selektionsmarker ein Ampicillinresistenzgen und ist etwa 6,9 kBp groß.

pCMV-Myc

Dieses Plasmid wurde durch Einklonierung des *c-myc*-Gens in das Plasmid pEQ176P2 erhalten und dient als c-Myc-Expressionsvektor. Es trägt als Selektionsmarker ein Ampicillinresistenzgen.

pCMV β -p300

Dieses Plasmid dient als Expressionsvektor für den Transkriptionsfaktor p300. Es trägt als Selektionsmarker ein Ampicillinresistenzgen und ist etwa 13 kBp groß.

pEQ176

Das Plasmid pEQ176 ist ein Expressionsvektor für β -Galaktosidase in Säugetierzellen. Das β -Galaktosidase-Gen wird von einem CMV-Promotor und einem SV40-Polyadenylierungssignal flankiert. Es existiert ein SV40 *ori* für die Replikation in Zelllinien, die das SV40 T-Antigen exprimieren. Für die Replikation in *E.coli* ist ein pBR322 *ori* vorhanden, und ein Ampicillinresistenzgen ermöglicht die Selektion. Der f_1 *ori* dient der Einzelstrangreplikation.

pEQ176P2

Dieses Plasmid ist aus dem Vektor pEQ176 durch eine Deletion des β -Galaktosidasegens hervorgegangen. Mit *PvuII* wurde ein ~2,9 kBp langes Fragment aus dem β -Galaktosidasegen herausgeschnitten und das Plasmid religiert. Durch Einklonierung des *c-myb* Gens wurde das Plasmid pEQ176P2Myb erhalten, das als c-Myb Expressionsvektor dient.

Die Expressionsplasmide für c-Jun und c-Fos wurden freundlicherweise von Peter Angel zur Verfügung gestellt. Die anderen Expressionsplasmide stammen aus der Arbeitsgruppe von Bernhard Lüscher.

2.3.9 Verwendete Zelllinien

Cos 7

Hier handelt es sich um Nierenzellen aus dem *african green monkey*. Cos 7-Zellen leiten sich von Zellen der CV-1 Zelllinie (*Cercopithecus aetiopiens*) ab, die mit einer Mutante des SV40-Virus, die einen Defekt auf dem *origin* trägt, transformiert wurde (Gluzman, 1981). Die Zellen enthalten ein in das zelluläre Chromosom integriertes SV40-Genom, das die Synthese des großen T-Antigens steuert. Eine Deletion im T-Antigen verhindert die Expression der viralen Gene, so dass kein Virus mehr freigesetzt werden kann. Die Zelllinie ist von der ZKBS (Zentrale Kommission für die biologische Sicherheit) in die Risikostufe 1 eingeordnet worden. Die Zellen wachsen

adhärent in einer Zellschicht (Monolayer) und besitzen eine Verdopplungszeit von ungefähr 35-48 Stunden. Als Medium für die Zelllinie wird DMEM mit 10% FCS, Penicillin/Streptomycin und Glutamat (siehe 2.3.1) verwendet. Als Vektoren in Cos 7-Zellen können Plasmide eingesetzt werden, die sich aus Anteilen bakterieller Plasmide, einem geeigneten Promotorbereich und dem *ori* des SV40 Genoms zusammensetzen. Durch das von den Cos 7-Zellen bereitgestellte T-Antigen können solche Plasmide extrachromosomal gehalten und vermehrt werden (Ibelgauffs, 1990).

HEK 293

Die HEK 293 (*human embryonic kidney*) Zelllinie wurde aus primären embryonalen Nierenzellen gewonnen. Die Zellen wurden mit dem Adenovirus Typ 5 behandelt und exprimieren das virale E1A-Protein, das den Zellzyklus der Wirtszelle verändert. Als Medium für die Zelllinie wird DMEM mit 10% FCS, Penicillin/Streptomycin und Glutamat (siehe 2.3.1) verwendet. Zur Verfügung gestellt wurde sie von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Martin (Institut für Molekularpharmakologie; Medizinische Hochschule Hannover).

TSA 3pG

Diese Zellen sind transformierte HEK 293 Zellen. Sie sind stabil mit dem SV40 *large* T-Antigen transfiziert worden, das die extrachromosomale Replikation des SV40 *ori* ermöglicht. Medium für die Zellen ist DMEM mit 10% FCS, Penicillin/Streptomycin und Glutamat (siehe 2.3.1). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Krampfl aus der Abteilung für Neurologie der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt.

HEL

Diese Zelllinie entstand aus Zellen, die einem 30-jährigen Patienten mit Erythroleukämie 1980 entnommen wurden. Die Zellen sind in der Lage, spontan und induziert Hämoglobin zu synthetisieren. Sie exprimieren den Erythropoetin-Rezeptor auf der Oberfläche. Die Zellen wachsen einzeln in Suspension und zeigen eine runde, große Morphologie, teilweise sind sie deutlich vergrößert und vielkernig (Martin, 1982). Die Verdopplungszeit liegt bei etwa 36 Stunden. Als Medium wird

RPML (siehe 2.3.1) mit 10% FCS verwendet. Die maximale Zelldichte sollte $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml nicht überschreiten.

U937

Die Zellen wurden 1974 einem 37-jährigen Patienten mit histiozytischem Lymphom (krankhafte Makrophagen) entnommen. Die Zellen tragen Marker und Eigenschaften von Monozyten (Sundstroem *et al.*, 1976) und exprimieren c-Myb in Abhängigkeit von ihrem Entwicklungsgrad (Westin *et al.*, 1982). Die Zellen wachsen als Suspension und zeigen eine rundliche Morphologie. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 30-40h. Als Kulturmedium wird RPML mit 10% FCS verwendet (siehe 2.3.1).

2.4 Arbeiten im Rahmen des *Phage-Display-Systems*

Einführung

Die Methode des *Phage-Display-Systems* ermöglicht die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Proteinfragmenten. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Expression von Proteinfragmenten als N-terminale Fusionsproteine mit Hüllproteinen des filamentösen Phagen M13 (Smith, 1985). Dazu werden die Sequenzen einer cDNA-/Peptid-Bibliothek oder eines zu untersuchenden Proteinfragmentes in einen Phagemid Vektor kloniert, der dieses als Fusionsprotein mit einem M-13 Hüllprotein exprimiert. Die so gebildeten rekombinanten Phagen präsentieren an ihrer Oberfläche die Fusionsproteine. Die Phagen tragen zusätzlich die genetische Information über die Fusionsproteine. Diese Kopplung von Genotyp und Phänotyp ermöglicht die anschließende Analyse der Protein-Wechselwirkung. Hiefür werden die Phagen über eine Oberfläche mit immobilisierten Proteinen oder Proteinfragmenten gegeben. Es folgen mehrere Selektionszyklen und gegebenenfalls Amplifikationen durch Passagieren der Phagen in das Wirtsbakterium. Diese Schritte führen zu einer spezifischen Anreicherung bestimmter Phagenpopulationen. Anschließend können diese spezifischen Bindungspartner isoliert werden, und die Identität des exponierten Proteinfragmentes kann durch Sequenzierung bestimmt werden. Da es sich um ein bakterielles System handelt, können Wechselwirkungen nach post-translationalen Prozessen nicht erkannt werden.

Arbeiten mit dem *Phage-Display-System*

Der Phage M13 gehört zu der Klasse der filamentösen Phagen. Er hat eine Länge von 895 nm und einen Durchmesser von 9 nm. Sein einzelsträngiges Genom besitzt 6047 Bp und kodiert 10 verschiedene Proteine, unter anderem die Strukturproteine g3p, g6p, g7p, g8p und g9p, die im *Phage-Display* modifiziert werden können (Makowski, 1993).

Der Infektionszyklus verläuft nicht lytisch und beginnt mit dem Kontakt über das Hüllprotein g3p an den F-Pilus eines F⁺-*E.coli*-Bakteriums. Anschließend wird das Genom des Phagen über den F-Pilus in das Bakterium geschleust und dort durch die Replikationsmaschinerie der Wirtszelle in die replikative doppelsträngige Form (dsRF) überführt. Diese dient als Template für die Transkription der Phagenproteine. Die neu gebildeten Phagenproteine ermöglichen nach der Replikation der Phagen-DNA eine *rolling-circle*-Replikation, durch die das Phagen-Genom in die einzelsträngige Form überführt wird. Die Phagenhüllproteine werden nun mittels so genannter *leader*-Sequenzen ins Periplasma der Bakterienzelle exportiert. Dort werden in einem als *assembly* bezeichneten Vorgang das Phagen-genom in die reifen Phagenpartikel verpackt und ohne Lyse durch die Zellwand und die äußere Membran ins Medium abgegeben. Ein Absterben der Wirtszelle kommt schließlich nach mehreren Durchgängen durch Akkumulation von toxischen Phagenkomponenten (g3p und g8p) zustande.

Im *Phage-Display* nutzt man die Eigenschaft des Phagen, beim *assembly* seine Phagenhüllproteine in das Phagen-Kapsid zu integrieren. Einzelne Hüllproteine werden im Überschuss als Fusionsproteine mit dem zu untersuchenden Protein angeboten und in die Phagen eingebaut. Die Fusionsproteine werden mit Hilfe von Phagemid-Vektoren kloniert, die die Information für nur ein Hüllprotein tragen. Diese hybriden Vektoren tragen neben der Information des Phagen auch einen *E.coli* Replikationsursprung und die für das *assembly* benötigte Information zum Umschreiben in einzelsträngige DNA.

Die fehlenden Informationen bringt nach der Infektion ein Helferphage mit in die Zelle. In diesem als *phage rescue* bezeichneten Verfahren liefert der Helferphage die benötigten Informationen für die Phagen-Produktion. Der *ori* des Helferphagen ist mutiert, so dass die DNA des Helferphagen nur unzureichend in die einzelsträngige Form überführt wird. Es wird vorwiegend die mehr vorhandene und zudem kleinere Phagemid-DNA in die rekombinanten Phagen verpackt.

2.4.1 Vermehrung von M13KO7-Helferphagen

100 μ l TG1-Zellen in 20 ml LB Flüssigmedium werden bei 37°C im Schüttelwasserbad bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}=0,5$ inkubiert. Nun werden 1×10^7 cfu M13KO7-Helferphagen zugegeben und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden bei 1000 g für 20 min zentrifugiert, und das Pellet in 100 ml LB^{Kan} über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.4.2 Isolierung der Phagen

Die Zellen der Übernachtskultur werden bei 1000 g für 20 min sedimentiert und der Überstand mit den Phagen wird in ein steriles 50 ml Reaktionsgefäß überführt.

Durch Zugabe von 1/5 Suspensionsvolumen PEG-NaCl und einer vierstündigen Inkubation bei 4°C, werden die Phagen aus der Lösung gefällt. Diese können nun durch Zentrifugation bei 6200 g für 2 Stunden sedimentiert werden. Das Pellet wird in 10 ml SM-Puffer (bei den Helferphagen) oder in 10 ml 1 x PBS, 0,1% (v/v) Triton X-100 (rekombinante Phagen) resuspendiert und durch einen Filter mit 0,45 μ m Porengröße sterilfiltriert.

Für die Konzentrationsbestimmung werden 20 ml LB-Medium mit 100 μ l kompetenten TG1-Zellen angeimpft und bei 37°C bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}=0,5$ inkubiert. Zur Bestimmung des Phagentiters wird nun eine Verdünnungsreihe mit ddH₂O hergestellt: 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵, 1:10⁶ und 1:10⁷.

Pro 10 μ l Phagenverdünnung werden je 1 ml TG1-Kultur gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die infizierten Zellen bei 3000 rpm für 5 min in einer Eppendorf Zentrifuge 5415 sedimentiert. Der Überstand wird dekantiert und das Pellet im Restmedium resuspendiert. Das Ausstreichen erfolgt bei den Helferphagen auf LB^{Kan} bei den rekombinanten Phagen auf LB^{Amp}-Platten. Über die Anzahl der gewachsenen Klone lässt sich nach [Anzahl der Klone x Verdünnungsfaktor x 100] der Phagentiter in cfu/ml bestimmen.

2.4.3 Vermehrung der rekombinanten Phagen

Zur Vermehrung rekombinanter Phagen werden 100 µl kompetenter TG1-Zellen mit 100 ng des rekombinanten Phagemidvektors transformiert und nach dem Hitzeschock bei 42°C in 800 µl LB-Medium (siehe 2.1.3) aufgenommen. Die Zellen werden nun bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Um die Transformationseffizienz zu überprüfen, können 50 µl des Transformationsansatzes auf einer LB^{Amp}-Platte ausgestrichen werden. Der Rest der Suspension wird in 20 ml LB^{Amp}-Medium aufgenommen und bei 37°C bis zu einer OD_{600 nm}=0,5 inkubiert, was 4 bis 6 Stunden dauert. Bei Erreichen der notwendigen OD werden 1 x 10¹⁰ cfu M13KO7-Helferphagen zugegeben und die Suspension eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden anschließend bei 1000 g 10 min zentrifugiert und das Pellet in 12 ml LB^{Amp}-Medium aufgenommen. Inkubation erfolgt bei 37°C über Nacht. Die Isolierung der Phagen geschieht wie unter 2.4.2 beschrieben.

2.4.4 Beschichtung der Mikrotiterplatten

Um das *Phage-Display* durchführen zu können, muss zunächst eine Mikrotiterplatte mit dem zu untersuchenden Protein beschichtet werden (*coating*). Hierzu werden die Proteinlösungen mit ddH₂O auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt. In jedes genutzte *well* der Platte werden 200 µl der Lösung pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dabei binden die Proteine an die Oberfläche der Mikrotiterplatte. Am nächsten Tag wird der Überstand vorsichtig mit der Pipette abgezogen. Die Platten sollten möglichst sofort im *Phage-Display* eingesetzt werden, sind jedoch einige Tage bei 4°C haltbar.

2.4.5 Das Panning

Die Untersuchung der Wechselwirkung der rekombinanten Phagen mit dem auf der Mikrotiterplatte immobilisiertem Protein wird *Panning* genannt. Um unspezifische Wechselwirkungen auszuschließen, wird für jeden Phagen ein unbeschichtetes *well* untersucht. Vor dem *Panning* wird in jedes *well* 300 µl Blockpuffer gegeben und die Platte bei RT 30 min inkubiert.

Nach der Inkubation wird der Blockpuffer aus den *wells* abgesaugt. 200 µl der auf 1×10^9 cfu eingestellten Phagenverdünnung werden in die zugehörigen *wells* pipettiert und bei 4°C für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wird die Phagensuspension abgesaugt und die *wells* gewaschen. Dafür werden in jedes *well* 250 µl *Phage-Display*-Waschpuffer pipettiert, wobei der Waschpuffer nicht direkt auf die Oberfläche der Mikrotiterplatte gegeben werden sollte, da sich die Phagen sonst leicht von der Platte lösen können. Der Waschpuffer wird für genau 3 min in den *wells* gelassen, bevor er vorsichtig abpipettiert wird. Es folgen mindestens 25 Waschschriffe, dabei muss für jedes *well* eine neue Pipettenspitze benutzt werden, da die Phagen an den gebrauchten Spitzen zu Kontaminationen der anderen *wells* führen können.

Zu Beginn des Waschens wird eine Kultur mit 20 ml LB-Medium mit 10 µl TG1-Bakterien angeimpft und bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}=0,5$ inkubiert. Um die Effizienz des Waschens zu verfolgen wird jeder 5. Waschschriff aufgehoben und nach Beendigung des Waschens mit 500 µl der TG1-Bakterien für 30 min bei 37°C inkubiert. In jedes benutzte *well* werden 200 µl der TG1-Bakterien gegeben und ebenfalls 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation werden die aufgefangenen Waschschriffe 5 min bei 16.000 g sedimentiert und das Pellet auf LB^{Amp}-Platten ausgestrichen. Die Bakteriensuspension aus der Mikrotiterplatte wird sorgfältig mit einer 200 µl Pipette resuspendiert und anschließend auf LB^{Amp}-Platten ausgestrichen.

Nach Inkubation der Platten über Nacht im Brutschrank können die Klone auf den Platten ausgewertet werden. Dabei bedeutet eine hohe Zahl an Klonen eine größere Wechselwirkung. Bei den Waschschriffen sollte eine deutliche Abnahme der Kolonien zu beobachten sein, sonst sollten die Waschschriffe gründlicher durchgeführt werden. Da das Ergebnis eines *Phage-Displays* sehr stark von der Prozedur des Waschens (Einwirkzeit, aufpipettieren, usw.) abhängt, lässt sich das Ergebnis nur innerhalb einer Platte mit dem leeren *well* als Referenz vergleichen. Man erhält so Werte, die als n-fache Aktivität gegenüber dem Referenzwert angegeben werden können.

Puffer und Medien für das *Phage-Display*

PBS

136 mM NaCl
21,7 mM KCl
4,5 mM Na₂HPO₄
pH 7,4 einstellen

SM-Puffer

100 mM NaCl
10 mM MgSO₄
50 mM Tris/HCl, pH 7,5
0,01% Gelatine
Sterilfiltrieren mit Porengröße 0,45 µm

PEG/NaCl

20%(w/v) Polyethylenglycol
14,6%(w/v) NaCl
autoklavieren

Blockpuffer

1% BSA
0,1% Triton X-100

***Phage-Display* Waschpuffer**

PBS
0,1%(v/v) Triton X-100

2.5 Molekularbiologische Methoden

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

Für die Präparation von Plasmid DNA aus *E.coli* wurden Materialien und Vorschrift der Firma Qiagen verwendet.

Bei der Methode handelt es sich um eine Kombination aus der alkalischen Extraktionsmethode (Birnboim *et al.*, 1979) gefolgt von einer

säulenchromatographischen Aufreinigung. Je nach benötigter DNA Menge werden drei unterschiedliche Protokolle entsprechend den Herstellerangaben benutzt.

Minipräparation

Für die Minipräparation wird eine 4 ml LB-Kultur mit transformierten *E.coli* Zellen für mindestens 12 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen werden bei 3500 g sedimentiert und der Überstand abgegossen. Das Pellet wird in 250 µl Puffer P1 aufgenommen. Durch Zugabe von 250 µl P2 erfolgt der Zellaufschluss für 1 Minute bei RT. Nach Zugabe von 350 µl Puffer N3 werden die Proben für 10 min auf Eis inkubiert, bei 16.000 g zentrifugiert und der Überstand über eine *QIAprep*-Säule aufgereinigt. Die Säule wird mit 750 µl Puffer PE gewaschen und die Plasmid DNA mit 40 µl Puffer EB eluiert.

Midipräparation

Bei der Midipräparation werden 100 ml Kultur eingesetzt. Die Zellen werden bei 4000 g sedimentiert und in 4 ml Puffer P1 aufgenommen. Der Aufschluss erfolgt mit 4 ml P2 für 5 min bei RT, und die Neutralisation mit 4 ml Puffer P3 für 20 min aus Eis. Anschließend wird die Lösung für 30 min bei 6300 g und 4°C zentrifugiert. Zur Reinigung der sich im Überstand befindenden Plasmide wird eine Tip-100 Säule der Firma Qiagen verwendet. Diese Säule wird zuvor mit 10 ml QBT äquilibriert und die Plasmidlösung durch ein Filterpapier aufgegeben. Die Säule wird zweimal mit 10 ml QC gewaschen und die Plasmide mit 5 ml QF eluiert. Die Plasmide werden nun mit 5 ml Isopropanol gefällt, bei 6300 g 30 min zentrifugiert und in 5 ml 70% Ethanol aufgenommen. Die Plasmide werden bei 6300 g 10 min zentrifugiert, das Pellet bei 37°C getrocknet und in 150 µl EB aufgenommen. Die Konzentration der Plasmidlösung wird mittels Agarosegel oder UV-Spektrum ermittelt.

Maxipräparation

Die Präparation im Maxi-Maßstab erfolgt analog der Midipräparation. Das Kulturvolumen beträgt hier 500 ml. Dementsprechend werden die anderen Puffermengen verändert. Es werden je 10 ml P1, P2 und P3 eingesetzt. Äquilibriert wird mit 25 ml QBT, gewaschen mit 2 x 30 ml QC und die Plasmide werden mit 15 ml QF eluiert. Die Fällung erfolgt mit 15 ml Isopropanol beziehungsweise 10 ml Ethanol. Das getrocknete Pellet wird in 250 µl EB aufgenommen.

Puffer für die Plasmidpräparation**Puffer P1**

50 mM Tris/HCl pH 8,0

10 mM EDTA

100 µg/ ml RNase A

Lagerung bei 4°C

Puffer P2

200 mM NaOH

1% (w/v) SDS

Puffer P3

3 M Kalium-Acetat, pH 5,5

Puffer N3

4,09 M Guanidiumhydrochlorid

0,759 M Kalium-Acetat, pH 4,2

Puffer PE

70% (v/v) EtOH

100 mM NaCl

10 mM Tris/HCl, pH 7,0

1 mM EDTA, pH 7,5

Puffer EB

10 mM Tris/HCl, pH 8,5

Puffer QBT

750 mM NaCl

50 mM MOPS, pH 7,0

15 % (v/v) Isopropanol

0,15 % (w/v) Triton[®] X-100

Puffer QC

1 M NaCl

50 mM MOPS, pH 7,0

15 % (v/v) Isopropanol

Puffer QF

1,25 M	NaCl
50 mM	Tris/HCl, pH 8,5
15 % (v/v)	Isopropanol

2.5.2 Konzentrationsbestimmung von DNA**2.5.2.1 Konzentrationsbestimmung mittels Agarose Gel-Elektrophorese**

Eine definierte Menge Plasmidlösung wird auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Als Standard wird je nach DNA Größe der *Massruler High* oder *Low Range* der Firma MBI aufgetragen. Nach der Ethidiumbromidfärbung kann anhand des Standards die Menge an aufgetragener DNA ermittelt werden.

2.5.2.2 Konzentrationsbestimmung mittels UV-Spektrum

Zur Ermittlung des Spektrums wird 1 µl der DNA-Lösung in 99 µl Puffer aufgenommen und das Spektrum von 240 bis 320 nm aufgenommen. Die Konzentration nach der Formel $A_{260nm} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$ in [µg/µl] ermittelt.

2.5.3 Präparation von RNA und mRNA aus eukaryontischen Zellen

Die Präparation von RNA bzw. mRNA erfolgte nach dem Protokoll der Firma Qiagen mit dem *RNeasy*[®] bzw. dem *Oligotex Direct mRNA*[™] Kit.

2.5.4 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarose erfolgt mittels eines *QIAquick Gel Extraction Kits* nach dem Protokoll *QIAquick Gel Extraction Kit Protocol*[™] der Firma Qiagen. Hierbei wird die in wässriger Lösung befindliche DNA an eine Silikagel-Membran gebunden, gewaschen und eluiert.

Durchführung der Gel-Extraktion

Nach der Agarosegel-Elektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung werden die gewünschten Banden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten, mit der im Protokoll angegebenen Menge QG Puffer versetzt und im Heizblock bei 50°C inkubiert, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hat. Dann wird die Lösung mit

der entsprechenden Menge Isopropanol versetzt und auf eine *QIAquick Spin* Säule gegeben. Die Flüssigkeit wird bei 16.000 g durch die Säule zentrifugiert. Anschließend wird die Säule mit 750 µl Puffer PE gewaschen und mit 40 µl EB eluiert.

Puffer für die Gel-Extraktion

Die Puffer entsprechen denen in 2.5.1 beschriebenen Puffern.

2.5.5 DNA-Modifikationen

2.5.5.1 Restriktionsspaltung von DNA

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme für analytische und präparative Spaltungen wurden jeweils in den von der Herstellerfirma mitgelieferten Puffern und Bedingungen inkubiert.

Das Ansatzvolumen beträgt üblicherweise bei analytischen Restriktionsspaltungen 1 µg DNA bei 5 U Enzym in 10 µl Volumen. Bei präparativen Ansätzen werden 5 bis 10 µg DNA mit 30 U Enzym in 50 µl Volumen aufgenommen. Die Inkubation erfolgt für eine Stunde bei der angegebenen Temperatur.

Puffer für Restriktionsenzyme

Für die Ansätze wurden jeweils die Puffersysteme nach Angaben des Herstellers verwendet. Bei Ansätzen mit zwei Restriktionsenzymen wurde nach Herstellerangaben der optimale Puffer ermittelt. Bei Aktivitäten unter 50% wurden die Restriktionsspaltungen in mehreren Teilschritten, in dem jeweiligen optimalen Puffer und einer Aufreinigung über eine *Qiaquick-Säule* (siehe 2.5.7), durchgeführt.

2.5.5.2 Ligation von DNA

Zur Ligation wird die T4-DNA-Ligase der Firma MBI-Fermentas verwendet. Dabei werden ungefähr 150 ng des Rahmens im molaren Verhältnis 1:2 bis 1:6 mit dem einzufügenden Nukleotid angesetzt. Dabei wurden mehrere Ansätze mit unterschiedlichen *insert*-Konzentrationen pipettiert. Ein Ansatz sollte nur Rahmen enthalten und dient als Kontrolle, ob der Rahmen religiert. Das Ansatzvolumen sollte um die 30 µl oder mehr betragen. Die Ligation erfolgt für 1 Stunde bei 37°C

(*sticky end*), oder bei 15°C über Nacht (*blunt end*). Als Puffer wird 10 x *Ligation buffer* (MBI-Fermentas) verwendet.

Der Ligationsansatz wird anschließend direkt einer Transformation in *E.coli* unterzogen (siehe 2.1.4).

2.5.5.3 Dephosphorylierung von DNA

Bei der Klonierung eines Rahmens mit kompatiblen Enden, ist es notwendig die Enden zu dephosphorylieren, um eine Religation des Rahmens zu verhindern. Dazu wird die DNA mit 1,5 U/20 pmol DNA CIAP (*calf intestine alkaline phosphatase*) (MBI-Fermentas) in 10 x CIAP-Reaktionspuffer oder einem der Restriktionspuffer versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Um die Phosphatase zu inaktivieren, wird der Ansatz für 15 min auf 85°C erhitzt. Zusätzlich wird die DNA über eine *Qiaquick-Säule* aufgereinigt (siehe 2.5.7).

2.5.5.4 Phosphorylierung von DNA

Bei dephosphorylierten Rahmen ist es für die Ligation unbedingt notwendig, dass die DNA-*inserts* Phosphat-Gruppen an ihrem 5'-Ende tragen. Die Phosphorylierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem Enzym T4-Polynukleotid-Kinase der Firma MBI-Fermentas. Hierzu werden 1 µg DNA in 10 x Reaktionspuffer mit ATP für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die DNA über eine *Qiaquick-Säule* aufgereinigt (siehe 2.5.7).

2.5.6 PCR

Die *Polymerase Chain Reaction* (PCR) ist eine Möglichkeit, DNA zu amplifizieren. Dies kann zum Beispiel beim Überprüfen von Plasmiden nach einer Klonierung genutzt werden, falls passende *primer* vorhanden sind, die das neue *insert* einschließen. Auch die Klonierung neuer Gene oder Genteilstücke aus cDNA ist möglich. Über die eingesetzten *primer* können darüber hinaus Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingeführt werden.

Für die analytischen PCR-Ansätze wurde die *Taq*-Polymerase der Firma MBI-Fermentas eingesetzt. Die *Taq*-Polymerase stammt aus dem Bakterium

Thermus aquaticus, sie ist hitzestabil und arbeitet mit einer Geschwindigkeit von 1000 Basen pro Minute bei einer Fehlerquote von 1×10^{-4} .

Für Klonierungen wird eine geringere Fehlerrate der Polymerase benötigt, deshalb wurden hierfür *proof reading*-Polymerasen, zum Beispiel aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-Polymerasen) eingesetzt.

Die *ExpandTM High Fidelity* Polymerase der Firma Boehringer Ingelheim besteht aus einer Mischung von *Taq*- und *Pwo*-Polymerasen. Die *Pwo*-DNA-Polymerase besitzt eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität, welche die Fehlerrate auf ein Drittel im Vergleich zu einer *Taq*-Polymerase reduziert.

Außerdem wurde die *proof start* DNA-Polymerase der Firma Qiagen eingesetzt. Bei dieser Polymerase handelt es sich um eine rekombinante 90 kDA DNA-Polymerase aus einem *Pyrococcus*-Stamm. Sie besitzt ebenfalls eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität und ist laut Herstellerangaben zehnmal genauer als die herkömmliche *Taq*-Polymerase. Da die *Pfu*-Polymerasen in der Regel um Faktor zehn langsamer arbeiten, sollte dies bei der Elongationszeit berücksichtigt werden.

Analytische PCRs werden üblicherweise in 25 µl Volumen durchgeführt. Für präparative Ansätze kann das Volumen auf bis zu 100 µl erhöht werden.

Beispiel für einen PCR-Ansatz:

Plasmid	1 µl (50-100 ng/µl)
dd H ₂ O	12 µl
10x PCR-Puffer	2,5 µl
d NTP's (2mM)	2,5 µl
5'Primer	2,5 µl (100 pmol/µl)
<u>3'Primer</u>	<u>2,5 µl (100 pmol/µl)</u>
<i>Taq</i> -Polymerase	(0,5U)

Die Bedingungen der PCR-Reaktion variieren sehr stark und sind abhängig vom eingesetzten *template*, dem *primer*-Paar und dem verwendeten Enzym.

Beispiel für ein Standard-PCR Programm

- 1 Zyklus
 - 94°C für 5 Minuten [Denaturierung]
- 20-25 Zyklen
 - 94°C für 30 Sekunden [Denaturierung]
 - 50-66°C für 30 Sekunden [Annealing]
 - 74°C für 1-10 Minuten [Elongation]
- 74°C für 2-15 Minuten [finale Elongation]

Die gewählte *annealing*temperatur hängt von den Schmelzpunkten der eingesetzten *primer* ab und muss gegebenenfalls für jedes *primer*paar optimiert werden.

Um die Spezifität der PCR zu erhöhen, wurde auch die *nested*-PCR eingesetzt. Hierbei wird zunächst eine PCR mit einem 5` und 3` *primer*paar durchgeführt. Auf dem so erhaltenden primären DNA-Fragment wird eine zweite PCR durchgeführt. Die *nested*-Primer werden dabei so gewählt, dass sie weiter innen im primären DNA-Fragment liegen. Mit dem Verfahren der *nested*-PCR kann die Selektivität einer PCR-Reaktion deutlich gesteigert werden, da störende Nebenprodukte aus der 1. PCR-Reaktion im zweiten Schritt nicht weiter amplifiziert werden.

Neben der *nested*-PCR wurde auch die Methode der *touchdown*-PCR angewandt. Hierbei wird mit einer *annealing*temperatur begonnen, die um einige Grad über der bestimmten Schmelztemperatur der Primer liegt. Diese *Annealing*temperatur wird schrittweise in jedem Zyklus um 0,5°C herabgesetzt. So soll sichergestellt werden, dass die Primer bei ihrer optimalen Temperatur arbeiten können. *Nested*-PCR und *touchdown*-PCR können auch kombiniert werden.

2.5.6.1 RT-PCR

Advantage[®] One-Step RT-PCR Kit der Firma Clontech

Das Umschreiben von RNA in DNA wurde mit dem *Advantage[®] One-Step RT-PCR Kit* von Clontech durchgeführt. Dazu werden 200 ng RNA nach Protokoll des Herstellers mit Reaktionspuffer und Zusätzen pipettiert:

5 µl	10 x <i>One-Step Buffer</i>
1 µl	50 x dNTP-Mix
0,3 µl	<i>Recombinant RNase Inhibitor</i> (50 U/µl)
25 µl	GC-Melt™
1 µl	Oligo (dT) <i>primer</i>
1 µl	50 x RT- <i>AdvanTaq Plus™ enzyme mix</i>
1 µl	PCR <i>primer Mix</i> (45 µM)
200 ng	mRNA
x µl	H ₂ O ad 50 µl

Die Lösung wird für 60 min bei 50°C inkubiert, gefolgt von 25 Zyklen bei 62°C (siehe 2.5.6). Die Analyse erfolgt mittels Gel-Elektrophorese (siehe 2.5.8).

2.5.6.2 Verwendete PCR-primer

Außenex3down:	5`-CTCCAAGGCTGGTGAGCCG-3`
AußenC-Termupstr	5`-GCACAACCTGGTGAAGAACCTGCAA-3`
5`ESTrcd	5`-CCCAAGCTTTCGTGTCCTTCCAAGCCTGC-3`
MH2	5`-CCCGAGCTCGTTTGGAGCGGCCGCCGCAC-3`
Gal4 Forward	5`-TACCACTACAATGGATG-3`
2861	5`-CGCGGATCCCGTACCGACGTTCCCTG-3`
Ccr4dsred5`	5`-GAGGTACCATGTATAACAATTATGTCTTC-3`
Ccr4dsred3`	5`-AGGGATCCTCAAGGCTGTCTCTGAA-3`
5`Dlxin	5`-CTCAACCCAGAAGAAGCC-3`
3`Dlxin	5`-ACTCCTCTCGAGCTCAACCCAGAAGAAGCCA-3`
Sexc1	5`-AGCGGATCCGAAATGCTGGTTTGCTACAD-3`
Sexc2	5`-CGCCCCGGGGTTCAGAACTTGCCCTGCTT-3`

2.5.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgt nach dem Protokoll *QIAquick PCR Purification Kit* der Firma Qiagen. Die Methode kann genutzt werden, um DNA-Fragmente bis ETWA 10 kBp aufzureinigen, oder Enzyme aus den Ansätzen zu entfernen.

Durchführung

Der PCR-Ansatz wird mit dem fünffachen Volumen PB Puffer versetzt und auf eine *QIAquick Spin Säule* gegeben. Die Lösung wird bei 16.000 g zentrifugiert und die

Säule mit 600 µl PE gewaschen. Die Elution der gereinigten DNA erfolgt mit 30 µl EB Puffer.

Puffer für die Aufreinigung von PCR-Produkten

Es wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

2.5.8 Gel-Elektrophorese

2.5.8.1 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese eignet sich zur Auftrennung von DNA-Fragmenten ab einer Größe von circa 200 Bp. Sie kann im analytischen oder präparativem Ansatz erfolgen. Die Konzentration der Agarose beträgt 0,7-2% in 1 x TPE-Puffer.

Die Agarose wird eingewogen und in der entsprechenden Menge Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Nach 15minütigem Abkühlen wird die Lösung in die Gelkammer gegossen, und die Kämme werden eingesetzt. Größe und Anzahl der Taschen richtet sich dabei nach den vorhandenen Proben. Nachdem das Gel erstarrt ist, wird es mit 1 x TPE bedeckt. Die DNA-Proben werden mit 6 x Agarose-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen pipettiert.

Die Auftrennung der Proben erfolgt unter Wasserkühlung bei 80-100 mA für etwa 4 Stunden, oder bei 15 mA über Nacht.

Anschließend wird das Gel 15 min in 0,04%iger Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und 30 min in H₂O entfärbt. Die Dokumentation erfolgt mit dem Videosystem Classic Uno der Firma INTAS bei 312 nm.

Puffer und Lösungen für Agarosegele

TPE-Puffer (10x)

0,9 M Tris-Base

20 mM EDTA

pH 8,0 mit H₃PO₄ einstellen

Auftragspuffer für Agarosegele (MBI-Fermentas) 6 x

50 mM EDTA

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 % (w/v) Xylencyanol FF

30 % (v/v) Glycerin

2.5.8.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAAGE)

Für DNA-Fragmente der Größe 50 bis 1000 Bp eignet sich die Auftrennung mit der Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAAGE). Es werden Gele der Größe 9 x 7 x 0,1 cm benutzt. Ein Gel besteht aus 6-10 Acrylamid in 1x TPE-Puffer. Vor dem Befüllen muss die Kammer mit Agarose abgedichtet werden, um ein Ausfließen der flüssigen Acrylamid-Lösung zu verhindern. Die Polymerisation wird nach Zugabe von 20 µl TEMED und 20 µl 40% Ammoniumperoxodisulfat (APS) gestartet. Die Lösung wird rasch zwischen die zwei Glasplatten, die die Kammer bilden, gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach etwa 20 min ist die Polymerisation abgeschlossen und das Gel wird in die Elektrophoreseapparatur gespannt. TPE-Puffer dient als Laufpuffer. Die Proben werden mit 2 x Azorubin-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgt bei 30 mA circa eine Stunde. Anschließend wird das Gel 5 min in 0,05%iger Ethidiumbromid-Lösung gefärbt und 10 min in Wasser entfärbt. Die Dokumentation erfolgt mit dem Videosystem Classic Uno der Firma INTAS.

Lösungen für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese

TPE-Puffer (10x)

0,9 M Tris-Base
20 mM EDTA
pH 8,0 mit H₃PO₄ einstellen

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung

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

Azorubinauftragspuffer (AAP) für Acrylamidgele 2x

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

2.5.8.3 Längenmarker für Gel-Elektrophoresen

1 kb DNA-Leiter, MBI-Fermentas

Der Marker enthält 14 definierte Fragmente mit einer Länge von 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, **2000**, 1500, 1000, 750, 500 und 250 Basenpaaren.

100 bp DNA-Leiter, MBI-Fermentas

Der Marker enthält 11 definierte Fragmente mit einer Länge von 1000, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100 und 80 Basenpaaren.

2.5.8.4 SDS-PAAGE nach Laemmli

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt mittels SDS-PAAGE (Laemmli, 1970). Sie wird sowohl für die Überprüfung von Induktionen bei Expressionsexperimenten als auch zur Reinheitsbestimmung bei der Proteinaufreinigung und der Isolierung von Proteinen im *Pull-Down-Assay* eingesetzt. Das Gel besteht aus zwei Teilen. Im Sammelgel werden die Proteine zunächst fokussiert, was zu schärferen Banden führt, bevor sie im Trenngel aufgetrennt werden. Die Gele sind wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 4 Zusammensetzung des Trennungsgels

Trenngel

Substanzen	5%	10%	15%
1,5M Tris Puffer [ml]	7,5	7,5	7,5
1% SDS [ml]	3,0	3,0	3,0
30% Acrylamid-Lsg. [ml]	5,0	10,02	15
ddH ₂ O [ml]	14,5	9,48	4,5
TEMED [µl]	45	45	45
40% APS [µl]	45	45	45

Tabelle 5 Zusammensetzung des Sammelgels

Sammelgel 5%

Substanzen	ml
0,5M Tris Puffer [ml]	1,14
1% SDS [ml]	1,5
30% Acrylamid-Lsg. [ml]	1,51
ddH ₂ O [ml]	4,86
TEMED [µl]	22,5 µl
40% APS [µl]	22,5 µl

Die Elektrophorese erfolgt in Laemmli-Laufpuffer bei 30 mA für etwa 90 min. Die Proben werden in 3 x Laemmli-Auftragspuffer aufgenommen und für 5 min auf 95°C erhitzt. Im Anschluss daran kann das Gel gefärbt, oder die Proteine auf eine Membran geblottet werden.

Lösungen für die Laemmligel-Elektrophorese

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung

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

Laemmli-Laufpuffer (10x)

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

Laemmli-Auftragspuffer (LAP) 3x

0,2 M Tris-Base
33 % Glycerin
3 % SDS
auffüllen auf 60 ml; pH 6,8 einstellen,
3,2 % β -Mercaptoethanol
0,0016 % (w/v) Bromphenolblau
ad 62 ml H₂O

2.5.8.5 Marker für Laemmligele

Protein-Größenstandard (10 kDa Protein Ladder, Gibco BRL)

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

Rainbow-Marker (Amershan Pharmacia Biotech)

Der *Rainbow-Marker* enthält definierte Fragmente der Größen 250, 160, 105, 75, 50, 35, 30, 25, 15 und 10 kDa. Diese Fragmente sind unterschiedlich gefärbt, so dass sie auf einer Membran ohne zusätzliche Färbungen zu sehen sind.

2.6 Proteinbiochemische Arbeiten

2.6.1 Proteinaufreinigung

2.6.1.1 Aufreinigung von (His)₆-tag-Proteinen

Die Expression der von (His)₆-tag-Proteine erfolgt wie unter 2.1.5 beschrieben. Nach dem Abzentrifugieren werden die Zellen in Aliquots zu 50 ml PDL mit 1% Triton X-100 und 400 µl PMSF (Pheny-Methyl-Sulfonylflurid) aufgeteilt. Die Zellen werden 3 x 30 Sekunden mit jeweils 45 Sekunden Pause im Ultraschallbad auf Eis (Branson Sonifier 250, Stufe 6) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer werden bei 6000 g und 4°C für 60 min sedimentiert. Die (His)₆-tag-Proteine befinden sich im Überstand. Zur Aufreinigung wird zum Zelllysat 1 ml Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen) gegeben und die Mischung für 2 Stunden bei 4°C geschüttelt. Anschließend wird die Lösung in eine Säule mit Fritte gegeben und mit 50 ml PDL 10 mM Imidazol gewaschen. Das Protein wird mit steigenden Konzentrationen Imidazol in PDL fraktioniert eluiert. Die Imidazolkonzentration bei der das Protein eluiert variiert je nach Protein zwischen 20 und 200 mM Imidazol. Die Waschritte und die aufgefangenen Fraktionen können auf einer SDS-PAAGE aufgetrennt (siehe 2.5.8) werden. Bei geringen Konzentrationen werden die Proben zuvor mittels TCA-Fällung (siehe 2.6.2) konzentriert. Für einige Anwendungen ist es darüber hinaus notwendig, das enthaltende Imidazol durch Dialyse zu entfernen. Hierzu werden die Proben in einen Dialyseschlauch *Visking dialysis tubing 8/32* oder *36/32* der Firma Serva gegeben und gegen 2000 ml in PDL über Nacht bei 4 °C unter leichtem Rühren inkubiert.

2.6.1.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Bei der Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen werden die induzierten Zellen nach dem Ernten und der Zentrifugation (siehe 2.1.5) in PBS mit 1% Triton X-100 und 400 µl PMSF aufgenommen. Der Aufschluss der Zellen erfolgt wie bei der Aufreinigung von (His)₆-tag-Proteinen beschrieben. Das Zelllysat wird mit 1 ml GSH-Sepharose der Firma Amershan Pharmacia Biotech versetzt und unter schütteln für 1 Stunde bei RT inkubiert. Die Suspension wird in eine Säule gefüllt und mit 30 ml PBS gewaschen. Für die Elution des Proteins wurden zwei Methoden angewandt:

Elutionsmethode A:

Das Protein wird mehrmals mit 1 ml PBS 50 mM Glutathion eluiert. Um das Glutathion vom Protein zu trennen, wird anschließend über Nacht bei 4°C in 2000 ml PBS dialysiert.

Elutionsmethode B:

Hierbei wird das Protein durch Spaltung mit Thrombin von der Säule gelöst. Dafür wird das Säulenmaterial in 10 ml PBS und 2 mM CaCl₂ mit 5 U Thrombin für 4 bis 12 Stunden bei 4 °C inkubiert. Anschließend kann das Säulenmaterial bei 1000 g abzentrifugiert werden. Das Protein befindet sich im Überstand.

2.6.1.3 Aufreinigung von Proteinen mit FC-tag

Der FC-tag besteht aus dem kristallisierbarem Anteil von Antikörpern (*fragment cristallizable*). Er besitzt eine hohe Affinität zu Protein A, was man sich bei der Aufreinigung von Fusionsproteinen zu nutze machen kann.

Die Aufreinigung erfolgte aus 2×10^7 eukaryontischen Zellen. Die Zellen wurden geerntet und die Zellkernextrakte (siehe 2.6.4) präpariert. Die Extrakte werden in 10 ml PBS aufgenommen und mit 10 µl Protein A (Sigma) bei RT 60 min inkubiert. Das Säulenmaterial wird mit 50 ml PBS 0,5 M NaCl gewaschen und direkt auf einem Laemmligel analysiert.

Puffer für die Proteinaufreinigung**PBS**

136 mM NaCl
21,7 mM KCl
4,5 mM Na₂HPO₄
pH 7,4 einstellen

PDL-Puffer

30mM KP_i, pH 7,5
100mM DTT
0,01% (v/v) Lubrol

2.6.2 Trichloressigsäure (TCA)-Fällung

Für die Aufkonzentration von Proteinproben mittels TCA-Fällung (Trichloressigsäure) werden die Proben mit 1/10 Volumen TCA (100 %) versetzt und bei -20 °C inkubiert. Nach dem Auftauen werden die Proben bei 16.000 g 20 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 20 µl LAP aufgenommen und mit 2 M Tris eingestellt, bis der Puffer einen blauen Farbumschlag zeigt.

2.6.3 DNA-Zellulose-Bindungs-Assay

Das DNA-Zellulose-Bindungs-Assay wurde benutzt, um die Fähigkeit von Proteinen zur Bindung an DNA zu überprüfen.

Hierfür werden etwa 150 ng Protein in 10 ml Puffer DB1 aufgenommen und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Suspension in eine Säule gefüllt und mit 5 x 1 ml Puffer DB2 eluiert. Dabei wird die KCl Konzentration des Puffers in 0,4 M Schritten erhöht. Die Proben werden mittels TCA-Fällung aufkonzentriert und auf einem Laemmligel analysiert. Bei einer Bindung des Proteins an DNA, sollte auch bei >1M KCl noch Protein an dem Säulenmaterial gebunden haben.

Puffer und Lösungen für den DNA-Zellulose-Bindungs-Assay

Puffer DB1

50 mM	Tris/HCl, pH 7,9
1 mM	DTT
20% (v/v)	Glycerin
0,1% (v/v)	NP 40

Puffer DB2

50 mM	Tris/HCl, pH 7,9
1 mM	DTT
20 % (v/v)	Glycerin
0,1 % (v/v)	NP 40
0,4-2 M	KCl

2.6.4 Präparation von Zellkernextrakten

Zur Präparation von Kernfraktionen werden 1×10^7 Zellen eingesetzt. Die Zellen werden zunächst von der Kulturflasche gelöst und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zentrifugationsschritte erfolgen bei 4°C, alle anderen Arbeitsschritte werden auf Eis durchgeführt. Die Zellen werden in 400 µl Puffer A aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellmembranen werden mit Ultraschall zerstört (3 x 5 Impulse). Ein Aliquot wird für eine Trypanblaufärbung entnommen, um sicherzustellen, dass die Membranen zerstört wurden. Das Zellysate wird nun bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Bei dieser Geschwindigkeit sedimentieren die Kerne. Der Überstand wird verworfen und das Pellet zweimal mit Puffer A gewaschen. Anschließend wird das Pellet in 40 µl Puffer C mit einer Kanüle resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Membranfragmente werden bei 13.000 g (bei 4°C) 10 min abzentrifugiert.

Puffer für die Zellkernextraktion

Puffer A

500 mM	Hepes, pH 7,9
500 mM	KCl
500 mM	EDTA, pH 8,0
500 mM	EGTA, pH 7,6
500 mM	MgCl ₂

Vor Versuchsbeginn frisch zusetzen:

100 mM	DTT
10,5 mM	Leupeptin

Puffer C

500 mM	HEPES, pH 7,9
2500 mM	NaCl
500 mM	EDTA, pH 8,0
500 mM	EGTA, pH 7,6

Vor Versuchsbeginn frisch zusetzen:

100 mM	DTT
100 mM	PMSF
10,5 mM	Leupeptin

2.6.5 Immunopräzipitation mit CNBr-aktivierter Sepharose

Bei der Kopräzipitation mit CNBr-Sepharose (*Pharmacia-Biotech*) wird ein Protein mit Hilfe eines an CNBr gekoppelten Antikörper gefällt. Falls sich ein Wechselwirkungspartner in der Extraktionslösung befindet, wird dieser kopräzipitiert. Zum Koppeln des Antikörpers an das CNBr wird ein Gramm CNBr-Sepharose 15 min mit 5 ml 1 mM HCl versetzt. Anschließend wird die Sepharose mit 200 ml 1 mM HCl gewaschen und in ein Gefäß mit Fritte überführt. Die Sepharose wird nun in 5 ml Kopplungspuffer aufgenommen und mit 1 μ mol Antikörper versetzt. Die Inkubation erfolgt bei 4°C über Nacht. Die Sepharose wird anschließend mit 5 ml Kopplungspuffer gewaschen, mit 10 ml Blockpuffer versetzt und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Abschließend wird mindestens dreimal abwechselnd mit je 5 ml Waschpuffer A und Waschpuffer B gewaschen und die Sepharose in 1 ml Blockpuffer aufgenommen.

Für die Kopräzipitation werden die 2×10^6 Zellen transfiziert und für drei Tage im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden Zellkernextrakte beziehungsweise die cytosolische Fraktion präpariert (siehe 2.6.4).

Diese Fraktionen werden für mindestens 5 Stunden bei 4°C inkubiert und dreimal mit 20 ml Waschpuffer A gewaschen. Die Sepharose wird direkt in Laemmli-Puffer aufgekocht und über ein SDS-Gel getrennt. Der anschließende *western-blot* (siehe 2.6.6) wird mit einem Antikörper gegen das kopräzipitierte Protein gefärbt.

Puffer für die Kopräzipitation

Kopplungspuffer

0,1 M NaHCO₃

0,5 M NaCl

pH 8,3

Blockpuffer

0,1 M Tris-HCl, pH 8,0

Waschpuffer A

0,1 M NaAc

0,5 M NaCl

pH 4,0

Waschpuffer B

0,1 M Tris-HCl, pH 8,0

0,5 M NaCl

2.6.6 Western-blot

Western-blots wurden nach dem Verfahren des *semy dry-blottings* durchgeführt. Hierbei wird das Acrylamidgel in *Transblot*puffer gelegt und eine PVDF-Membran (Fluorotrans®W Membran 2Micron, PALL) passgenau auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Das Laemmliigel wird für 2 min in *Blot*puffer gelegt und auf zwei in *Blot*puffer eingeweichte passgenaue Whatman-Papiere gelegt. Die PVDF-Membran wird in Methanol getränkt und luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Den Abschluss bilden zwei in *Blot*puffer getränkte Whatman-Papiere. Die Blotkammer wird geschlossen, mit circa 3 Kg beschwert und die Proteine bei etwa 2 mA/cm² für 100 min auf die Membran geblottet. Zur Kontrolle der Blot-Effizienz kann das Gel anschließend mit Coomassie oder Silber gefärbt (siehe 2.6.8) werden.

Die Membran wird nun für 30 min bei RT in Blotto inkubiert und anschließend mit TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgt bei 4°C über Nacht. Unspezifisch gebundener Antikörper wird anschließend mit TBS entfernt (dreimal 30 min). Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgt bei RT für zwei Stunden. Es folgen wiederum drei Waschrinne in TBS für je 20 min. Der sekundäre Antikörper ist mit *horse radish peroxidase* gekoppelt, die mittels einer Farbreaktion nachgewiesen wird.

Die Färbung wird mit einer selbst hergestellten Färbelösung (*western* Färbelösung) oder mit PM Blue POD Substrate der Firma Roche durchgeführt.

Puffer für das western-blotting

Blotpuffer

10 mM	Tris/HCl
100 mM	Glycin
12,5 %	Methanol

Blotto

2,5 g	Magermilchpulver
50 µl	Dextran
ad 50 ml	TBS

Western Färbelösung

0,5 g	Kobalt[II]chlorid
0,5 g	4-Chlor-1-naphtol
H ₂ O ₂	150 µl
ad 20 ml TBS	

2.6.6.1 Verwendete Antikörper

c-Myb

Als primärer Antikörper gegen die DNA-Bindungsdomäne von c-Myb wurde ein monoklonaler Maus IgG Antikörper eingesetzt (Sleeman, 1993). Der Antikörper (9E11) wurde von K.H. Klemnauer (Institut für Biochemie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster) zur Verfügung gestellt.

Als sekundärer Antikörper diente ein *goat anti mouse* IgG (H+L) horse *radish Peroxidase Conjugate*, *EIA Grade Affinity purified*, der Firma Biorad eingesetzt.

Rcd-1

Der Rcd-1 Antikörper wurde in der Arbeitsgruppe Heiner Wolfes hergestellt (Siegert, 1998).

Als sekundärer Antikörper diente ein *Goat anti-Rabbit* IgG (H+L) horse *radish Peroxidase Conjugate*, *EIA Grade Affinity purified*, der Firma Biorad.

His₆-Antikörper

Bei diesem Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Antikörper (Roche), der an Peroxidase gekoppelt ist.

Erythropoetin-Antikörper

Als primärer Antikörper zum Nachweis für Erythropoetin-Oberflächenrezeptoren wurde ein monoklonaler Maus-Anti-Mensch EPO R Antikörper der Firma *R&D Systems* eingesetzt.

Als sekundärer Antikörper diente ein FITC-anti-Maus AK (Fluorescein-5-isothiocyanat), der von Dr. Beate Sodeik (Virologie, Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt wurde.

2.6.7 Northern-blot

Bei einem *northern-blot* wird RNA auf eine Membran *geblottet*. Die Elektrophorese erfolgt in einem denaturierendem Formaldehyd-Agarosegel.

Für das Gel werden 2 g Agarose mit 15 ml 10 x MOPS-Puffer und 210 ml ddH₂O erhitzt. Nach dem Abkühlen auf 50°C werden 8,1 ml Formaldehyd und 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben. Als Laufpuffer wird 1 x MOPS verwendet. Das Gel läuft bei 50V für 4 Stunden. Anschließend wird es 3 x für 10 min in 10 x SSC gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen. Das Gel kann vor dem *blotten* dokumentiert werden.

Zum RNA Transfer wird das Gel auf zwei Filterpapiere gelegt, darüber wird die zurechtgeschnittene Hybond-N+-Membran (*Amershan Life Science*) gelegt, gefolgt von zwei weiteren Lagen Filterpapier und etwa 8 cm Papierhandtüchern. Den Abschluss bildet eine mit circa 700g beschwerte Glasplatte. Der *blot* erfolgt über Nacht.

Nach dem *blotten* wird die Membran für 1 Minute in 6 x SSC gewaschen und für 5 min bei 254 nm UV-Licht auf der Membran fixiert. Die Färbung erfolgt mit *AlkPhos Direct* (*Amershan Life Science*). Hierzu wird die verwendete Sonde nach Vorschrift mit alkalischer Phosphatase markiert. Anschließend wird die Membran mit der Sonde bei 55°C bis 65°C über Nacht im Hybridisierungsofen inkubiert und zweimal mit dem primären Waschpuffer für 10 min bei 55°C gewaschen. Es folgt ein weiterer

Waschschritt mit dem sekundären Waschpuffer für 5 min bei RT. Für die Detektion wird das Detektionsreagenz aufpipettiert und für 2 min bei RT inkubiert. Der *blot* wird in Folie gepackt, und ein Röntgenfilm wird aufgelegt. Die Inkubationszeit variiert je nach Signalstärke zwischen 10 min und 12 Stunden.

Puffer für den Northern Blot

10 x MOPS

0,2 M MOPS (N-Morpholino Propansulfonsäure)

0,05 M NaAC

0,01 M EDTA

20 x SSC

0,3 M Natriumcitrat

3 M NaCl

pH 7,0 einstellen

Die Puffer für die Färbung mit alkalischer Phosphatase sind alle im Lieferumfang des *AlkPhos Direct* von *Amershan Life Science* enthalten.

2.6.8 Proteinfärbung

2.6.8.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Assay dient zur Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen. Durch die Bindung an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nach 595 nm.

Um die Konzentration bestimmen zu können, benötigt man zusätzlich eine Eichreihe von 0 bis 10 µg/ml Protein. Die Methode ist für Proteinmengen von 1 bis 10 µg/ml geeignet, für höher konzentrierte Lösungen muss vor der Messung eine Verdünnung vorgenommen werden.

Für die Durchführung werden 0,5 ml der Probenverdünnung mit 5 ml Bradford-Reagenz vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 595 nm gemessen.

Puffer für das Bradford-Assay

Bradford-Reagenz

0,06% Coomassie Brilliant Blue G250

in 0,6N HCl

2.6.8.2 Coomassie-Färbung

Der Nachweis der Proteine mittels Coomassie-Farbstoff erfolgt durch kurzes Aufkochen des Gels in Coomassie-Färbelösung. Anschließend wird das Gel in 7%iger Essigsäure gekocht, bis das Gel entfärbt und die Proteinbanden sichtbar sind. Die Proteinmengen, die mit dieser Methode nachgewiesen werden können, liegen bei circa 0,3 µg/ Proteinbande.

Coomassie-Färbelösung

5 g Coomassie Brilliant Blue R250

1.25 g Coomassie Brilliant Blue G 250

1065 ml EtOH 95%

125 ml MeOH 100%

250 ml Essigsäure 96%

ad 2500 ml ddH₂O

2.6.8.3 Silberfärbung

Der Nachweis von geringeren Proteinmengen, erfolgt über eine Silberfärbung. Mit ihr können Proteinmengen von bis zu 2 ng/Bande nachgewiesen werden.

Hierzu wird das Laemmigel für 15 min in die Fixierlösung gelegt, anschließend wird zweimal für 5 min in ddH₂O gewaschen. Nun wird das Gel für eine Minute in eine 0,02%ige Na₂S₂O₃-Lösung gelegt und zweimal für 20 Sekunden gewaschen. Nun folgt die Färbung in 0,1%iger AgNO₃-Lösung. Das Gel wird noch dreimal für je 20 Sekunden mit ddH₂O gespült. Unter leichtem Schütteln wird der Entwickler (immer frisch ansetzen) zugegeben und weitergeschüttelt, bis die Proteinbanden gut sichtbar werden. Dann wird mit 5 ml Stopp-Lösung/100 ml Entwickler für 10 min abgestoppt. Zum Abschluss wird das Gel noch zweimal 5 min in ddH₂O gewaschen und kann anschließend fotografiert und getrocknet werden.

Lösungen für die Silberfärbung

Fixierer

80 ml Methanol
27 ml Formaldehyd, 35%
ad 200 ml ddH₂O

Entwickler

6 g Na₂CO₃
100 µl Formaldehyd, 35%
8 µl 10% Na₂S₂O₃

Stopp-Lösung

27 g Citronensäure
ad 50 ml ddH₂O

2.6.8.4 *Stains-All*

Zur Färbung von Proteinbanden auf PVDF-Membranen mittels *Stains-All* wird zunächst aus der Farbstoff Stammlösung eine Arbeitslösung hergestellt. Diese sollte vor jeder Färbung frisch angesetzt werden. Hierzu werden 10 ml der Stammlösung mit 10 ml Formamid und 50 ml Isopropanol gemischt (in dieser Reihenfolge!). 1 ml 3 M Tris pH 8,8 zugeben und mit ddH₂O auf 200 ml auffüllen. Gut schütteln, dabei vor Lichteinwirkung schützen. Die Färbung erfolgt für mindestens 3-4 Stunden oder über Nacht, dabei sollte die Membran vor Lichteinfall geschützt werden. Das Entfärben erfolgt für 5-10 min bei RT auf einem langsam laufenden Schüttler. Nach dem Entfärben wird kurz mit Wasser nachgespült. Die Membran kann anschließend im Dunkeln bei RT getrocknet werden.

Lösungen für die *Stains-All* Färbung

Fixierlösung

10 ml Glutaraldehyd 25%
115 ml ddH₂O

Farbstoff-Stammlösung 0.1%

0,1 g *Stains-All*
in 100 ml Formamid (lichtgeschützt bei 4°C etwa 30 Tage haltbar)

Entfärbelösung

10 ml	Formamid
80 ml	Isopropanol
100 ml	ddH ₂ O

2.6.9 Verwendete Computerprogramme

2.6.9.1 MultAlign

Für Alignements von DNA-Stücken wird das Programm MultAlign (*multiple sequence alignment*) von *Florence Corpet* verwendet. Hierbei müssen die zu vergleichenden Sequenzen als Textdatei eingefügt werden.

Das Programm kann im Internet unter <http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html> erreicht werden.

2.6.9.2 WinEasy

Das Programm WinEasy ist das Auswerteprogramm für die UV-Kamera. Hiermit können die Lichtintensitäten auf den Gelen verglichen werden, um Aussagen über die Konzentration auf den Gelen treffen zu können.

2.6.9.3 DNAmend

DNAmend [Version 1.02] ermöglicht das Betrachten und Bearbeiten von DNA-Sequenzen. Darüber hinaus können Restriktionskarten und -verdaus erstellt werden.

2.6.9.4 Chromas

Das Programm Chromas [Version 1.56] wurde zum Betrachten und Bearbeiten der Sequenziererergebnisse verwendet. Das Programm ist erhältlich unter <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>.

3 Durchführung und Ergebnisse

3.1 Untersuchungen des Kofaktors Rcd-1

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst ein putativer Kofaktor von c-Myb charakterisiert werden. Der Faktor Rcd-1 (*required for cell differentiation*) wurde von Frau Dipl. Biochem. Michaela Siegert im Rahmen ihrer Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Priv. Doz. Dr. Heiner Wolfes entdeckt. Die Arbeiten wurden mit dem *Yeast-Two-Hybrid*-System durchgeführt, indem eine embryonale Maus-cDNA-Bibliothek vom Tag 11 der Entwicklung gegen c-Myb als Köder eingesetzt wurde. Zu Beginn der Arbeit stand Rcd-1 als prokaryontischer und eukaryontischer Expressionsvektor zur Verfügung. Zunächst sollte die vermutete Wechselwirkung zwischen c-Myb und Rcd-1 aus dem *Two-Hybrid*-System bestätigt werden. Falls sich die Wechselwirkung bestätigen ließe, sollte im nächsten Schritt der mögliche Kofaktor näher charakterisiert werden.

3.1.1 Expression von Rcd-1 in *E.coli*

Zu Beginn der Arbeiten lag Rcd-1 in dem bakteriellen Expressionsvektor pQE30 vor und wurde als His₆-Fusionsprotein exprimiert. Die Aufreinigung wurde entsprechend 2.6.1 aus TG1-Zellen durchgeführt und das Protein mittels Ni²⁺-NTA-Agarose aufgereinigt (siehe Abbildung 16). Anschließend wurde das gewonnene Protein gegen PBS dialysiert.

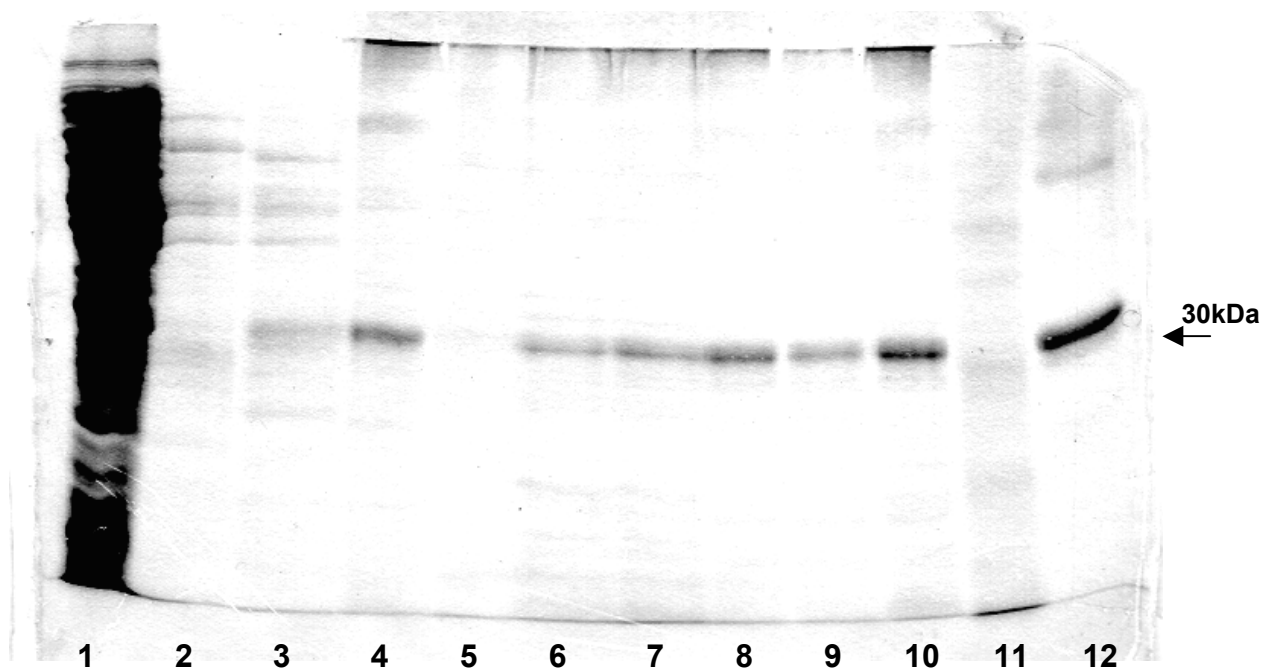


Abbildung 16: 15%iges Laemmliigel mit Fraktionen der Ni^{2+} -NTA-Agarose Aufreinigung von Rcd-1

Angegeben sind die jeweiligen Mengen Imidazol in Wasch- und Elutionspuffer
1: Überstand; 2: 10 mM; 3: 20 mM; 4: 75 mM; 5: leer; 6: 100 mM; 7: 125 mM;
8: 150 mM; 9: 175 mM; 10: 200 mM; 11: 10 kDa Proteinstandard; 12: vereinigte
Fraktionen 8-10 nach der Dialyse

Nach der Dialyse betrug die Reinheit des Proteins circa 95 %. Die Präparationen hatten üblicherweise Konzentrationen von 0,1 bis 0,4 mg/ml.

3.1.2 *Pull-Down-Assay* von Rcd-1 und der C-terminalen Domäne von c-Myb

Um die Wechselwirkung zwischen c-Myb und Rcd-1 aus dem *Two-Hybrid*-System zu bestätigen, wurde mit dem aufgereinigten Protein und der C-terminalen Domäne (AS 500-600) von c-Myb ein *Pull-Down-Assay* durchgeführt. 1 mg des Rcd-1 Proteins wurde an CNBr-Sepharose gebunden (siehe 2.6.5) und gewaschen. Um unspezifische Bindung an CNBr-Sepharose auszuschließen, wurde 1 mg EcoSSB an CNBr-Sepharose gebunden. Ferner diente Tris-Puffer gesättigte CNBr-Sepharose als Kontrolle. Auf die so behandelte Sepharose wurden je 80 μg der C-terminalen Domäne von c-Myb in 10 ml *Coupling* Puffer gegeben und über Nacht bei 4°C unter schütteln inkubiert. Die Säulen wurden anschließend mit 5 x 40 ml PBS gewaschen, das Säulenmaterial in 40 μl LAP aufgekocht und die Proben auf ein 15%iges Laemmliigel aufgetragen (siehe Abbildung 17).

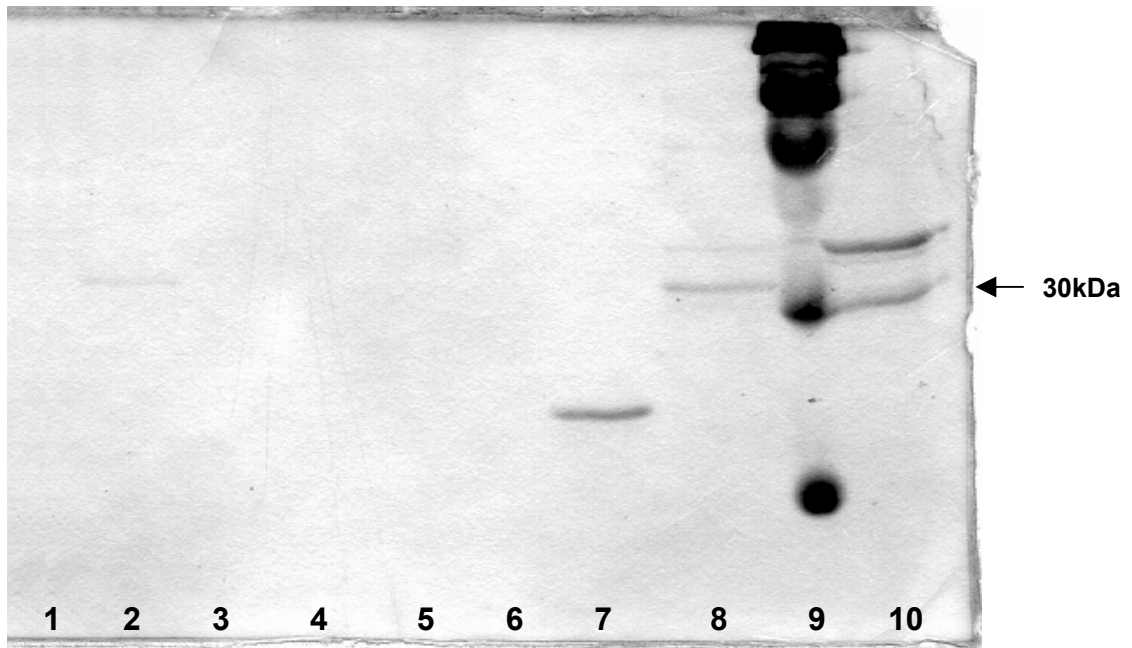


Abbildung 17: 15%iges Laemmliigel des *Pull-Down-Assays* von Rcd-1 und c-Myb AS500-600 (GST)

1: CNBr-Sepharose mit EcoSSB; 2: CNBr-Sepharose mit Rcd-1 ; 3: Überstand EcoSSB mit c-Myb AS500-600; 4: Überstand Rcd-1 mit c-Myb AS500-600; 5: letzter PBS-Waschschrift EcoSSB; 6: letzter PBS-Waschschrift Rcd-1; 7: Sepharose mit EcoSSB und c-Myb AS500-600; 8: Sepharose mit Rcd-1 und c-Myb AS500-600; 9: 10 kDa Proteinstandard; 10: c-Myb AS500-600

Die Proteine wurden anschließend auf PVDF-Membran geblottet, die Membran mit einem c-Myb spezifischen Antikörper inkubiert und mit *BM Blue POD Substrate* (Roche) angefärbt (siehe Abbildung18).



Abbildung 18: PVDF-Membran des *Pull-Down-Assays* von Rcd-1 und c-Myb AS500-600 gefärbt mit spezifischem c-Myb Antikörper

1: CNBr-Sepharose mit EcoSSB; 2: CNBr-Sepharose mit Rcd-1; 3: Überstand EcoSSB mit c-Myb AS500-600; 4: Überstand Rcd-1 mit c-Myb AS500-600; 5: letzter PBS-Waschschrift EcoSSB; 6: letzter PBS-Waschschrift Rcd-1; 7: Sepharose mit EcoSSB und c-Myb AS500-600; 8: Sepharose mit Rcd-1 und c-Myb AS500-600; 9: 10 kDa Proteinstandard; 10: c-Myb AS500-600

In Abbildung 17 sind in den *lanes* 1 beziehungsweise 2 die an die Sepharose gebundenen Proteine EcoSSB und Rcd-1 zu erkennen. In *lane* 8 ist zusätzlich die Bande von dem Myb-Fragment bei 37 kDa und die GST-Bande bei 27 kDa zu erkennen. Um sicherzustellen, dass es sich bei dieser Bande um das gebundene c-Myb Fragment handelt, wurde die Membran mit einem c-Myb spezifischen Antikörper gefärbt. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 zu sehen. Das c-Myb Fragment bleibt auch nach dem Waschen an der Rcd-Sepharose gebunden. An der EcoSSB-Sepharose und der leeren Sepharose (Ergebnis nicht dargestellt) dagegen kann das c-Myb Fragment nicht binden. Es konnte somit eine *in vitro* Wechselwirkung der beiden Proteine Rcd-1 und c-Myb AS 500-600 nachgewiesen werden.

3.1.3 Kopräzipitation von Rcd-1 mit c-Myb

Da für die *Pull-Down*-Versuche kein *full-length* c-Myb zur Verfügung stand, wurde eine Kopräzipitation von c-Myb und Rcd-1 aus nukleären Extrakten durchgeführt. Ein Vorteil der Methode ist, dass die Versuchsbedingungen den Bedingungen *in vivo* recht nahe kommen.

Für die Präzipitation wurden c-Myb und Rcd-1 in HEK 293 Zellen transfiziert, exprimiert und nach 48 Stunden geerntet. Anschließend wurden die Zellkernextrakte präpariert (siehe 2.6.4), mit 9E11 gekoppelter CNBr-Sepharose inkubiert und gewaschen (siehe 2.6.5). Die Sepharose wurde auf ein Laemmliigel aufgetragen und auf eine PVDF-Membran geblottet (siehe 2.6.6). Anschließend wurde die Membran mit einem Antikörper gegen c-Myb und Rcd-1 gefärbt. Die Färbung mit einem spezifischen Rcd-1 Antikörper ist in Abbildung 19 zu sehen. Nur in den Zellen, die mit c-Myb und Rcd-1 kotransfiziert wurden, ist Rcd-1 nachweisbar. Bei der Färbung mit einem spezifischen c-Myb Antikörper (Ergebnisse nicht dargestellt), war nur in Lane 2 und 4 war c-Myb nachweisbar. Das Protein bindet also an den Antikörper und wird durch die CNBr-Sepharose präzipitiert.

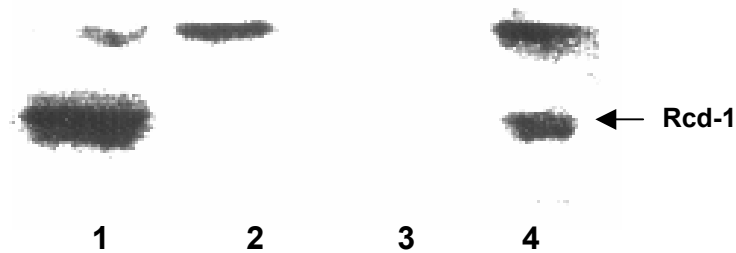


Abbildung 19: Western-blot der Kopräzipitation von c-Myb und Rcd-1 gefärbt mit einem spezifischen Rcd-1 Antikörper

1: Rcd-1 Protein als Kontrolle; 2: CNBr-Sepharose mit c-Myb transfizierten Zellkernextrakten; 3: CNBr-Sepharose mit Rcd-1 transfizierten Zellkernextrakten; 4: CNBr-Sepharose mit c-Myb und Rcd-1 transfizierten Zellkernextrakten

In der *lane* 2 und 3 sind jeweils nur c-Myb bzw. Rcd-1 transfiziert. Hier konnte Rcd-1 nicht präzipitiert werden. In 4 bindet das c-Myb Protein an den CNBr-gekoppelten Antikörper und wird präzipitiert. Zusätzlich bindet Rcd-1 an c-Myb und wird kopräzipitiert. In *lane* 1 ist Rcd-1 Protein als Größenvergleich aufgetragen. Mit dem Versuch konnte eine Wechselwirkung der beiden *full-lentgh* Proteine in Zellkernextrakten nachgewiesen werden.

3.1.4 Nachweis von Wechselwirkungen mit dem *Phage-Display-System*

Mit dem *Phage-Display* können Proteinwechselwirkungen empfindlich nachgewiesen werden (vergleiche 2.4). Hier wurde die Methode genutzt, um die Wechselwirkung von Rcd-1 mit dem c-Myb Protein AS 500-600 zu bestimmen. Als Kontrolle wurde BSA eingesetzt. Abbildung 20 stellt die ermittelten Koloniezahlen den einzelnen Waschrufen gegenüber.

Phage-Display mit Rcd-1

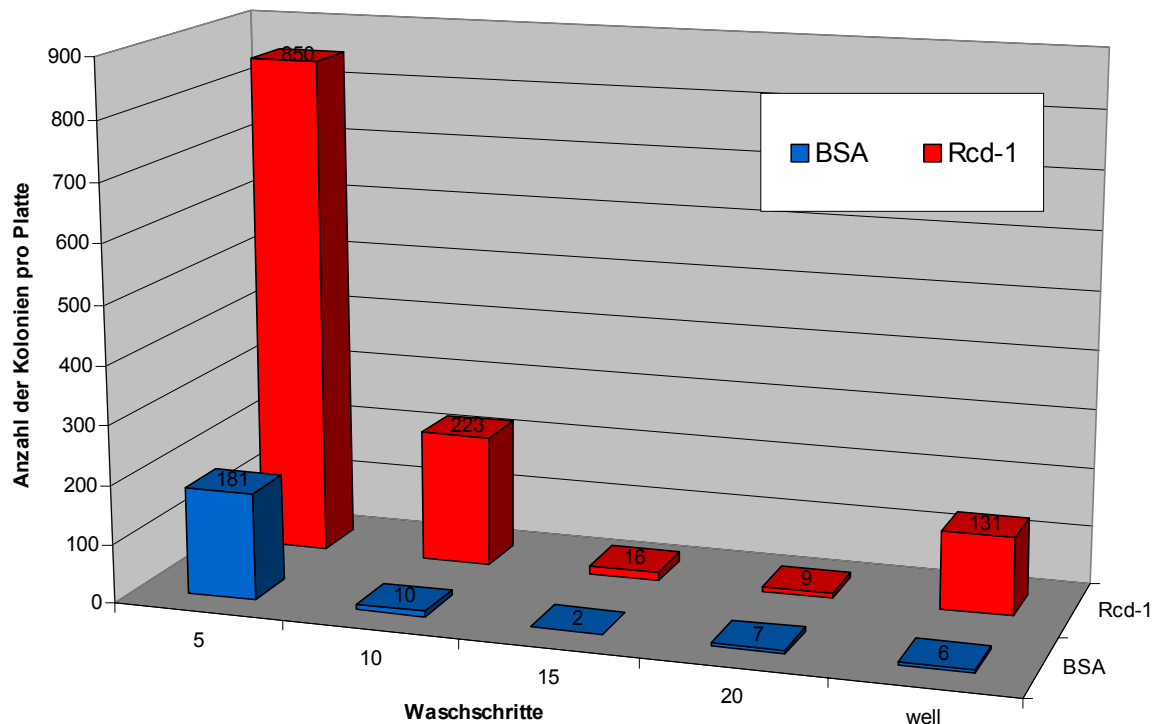


Abbildung 20: *Phage-Display* von c-Myb AS500-600 und Rcd-1

Von links nach rechts ist zunächst jeder 5. Waschschritt aufgetragen. Rechts sind die ermittelten Kolonien für die *wells*, in denen sich das Rcd-1 beziehungsweise BSA-Protein befand, aufgetragen

Die Versuche wurden wie unter 2.4.4 beschrieben durchgeführt. Wie in Abbildung 20 zu erkennen, nimmt mit zunehmendem Waschen die Zahl der abgelösten Phagen ab. Die Phagen haften jedoch an den mit Rcd-1 beschichteten *wells* deutlich besser. Erst nach 20 Waschritten sind annähernd gleich viele Klone in den *wells*. Die Proben, die direkt in die *wells* pipettiert wurden zeigen für Rcd-1 eine deutlich höhere Zahl an Klonen. Dies zeigt eine Wechselwirkung der beiden Proteine c-Myb und Rcd-1 an, die etwa um Faktor 20 höher liegt, als die Wechselwirkung zwischen c-Myb und BSA. Das Ergebnis bestätigt somit eine starke Wechselwirkung der C-terminalen Domäne von c-Myb und Rcd-1.

3.1.5 Ermittlung des Expressionsmusters von Rcd-1 mittels RT-PCR

Da c-Myb seine Funktion organspezifisch ausübt und in den Organen unterschiedlich stark exprimiert wird, kann ein Vergleich der Expressionsmuster von Rcd-1 und c-Myb Hinweise auf gemeinsame Beteiligung der beiden Proteine an zellulären Prozessen in den unterschiedlichen Geweben liefern.

Um das Expressionsmuster zu ermitteln, wurden zunächst Organproben aus einem 6 Monate alten Kaninchen (*white New Zealand rabbit*) entnommen. Es wurden Proben von Gehirn, Hoden, Leber, Mandeln, Milz, Thymus, Lunge, Niere, Herz, Knochenmark und der längsgestreiften Muskulatur entnommen. Die einzelnen Proben wurden eingewogen, mit flüssigem Stickstoff aufgeschlossen und die mRNA nach 2.5.3 präpariert.

Anschließend wurde aus der mRNA eine cDNA hergestellt (*Clontech Advantage RT-for-PCR Kit*). Mit der so gewonnenen DNA wurden im nächsten Schritt Semi-quantitative PCRs durchgeführt. Es wurden 20 Zyklen bei einer *annealing*-Temperatur von 48°C und einer Elongationszeit von zwei min durchgeführt. Die Proben wurden danach auf einem PAAGE-Gel aufgetrennt und mit dem *WinEasy*-Programm quantifiziert.

Einwaagefehler der Organe und Schwankungen bei der Ausbeute aus der RNA-Präparation wurden durch Normierung auf die Expressionsrate von β -Actin in den Proben ausgeglichen. Für die PCR zur Ermittlung der β -Actin Expression wurde die PCR mit 18 Zyklen bei einer *annealing*-Temperatur von 52°C und einer Elongationszeit von zwei min durchgeführt.

Die Ergebnisse für c-Myb und Rcd-1 sind in den Abbildung 21 und 22 dargestellt. Dabei stellen die Balken relative Lichtintensitäten dar und können daher nur im Verhältnis zueinander interpretiert werden.

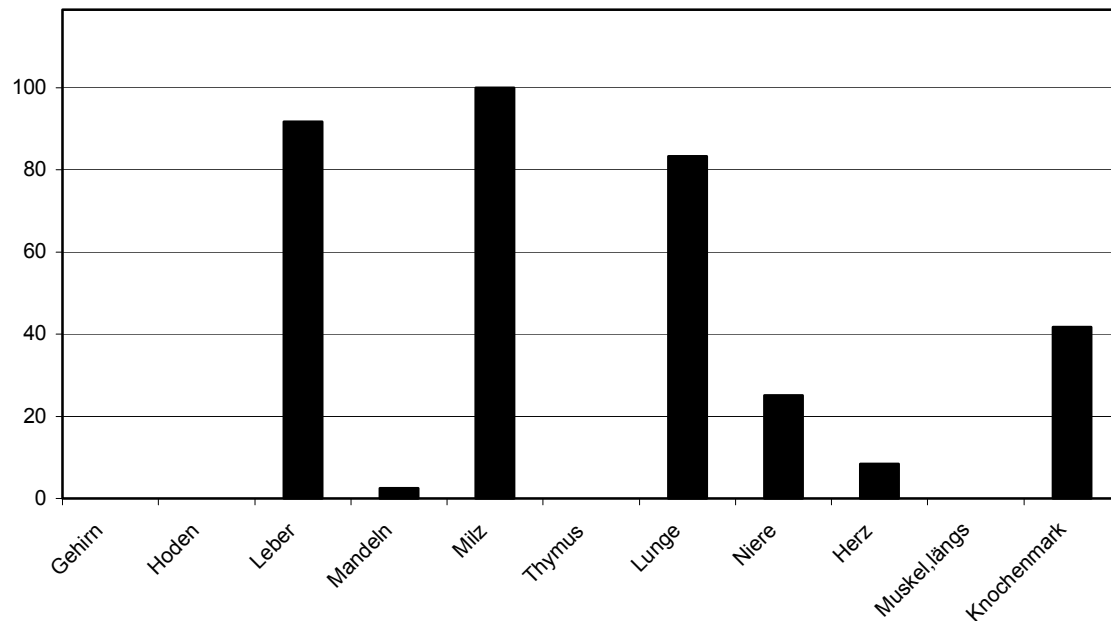


Abbildung 21: Expressionsmuster verschiedener Organe aus dem Kaninchen mit Hilfe der RT-PCR. Die hier dargestellten Daten beziehen sich auf c-Myb und sind auf die Werte für β -Actin normiert

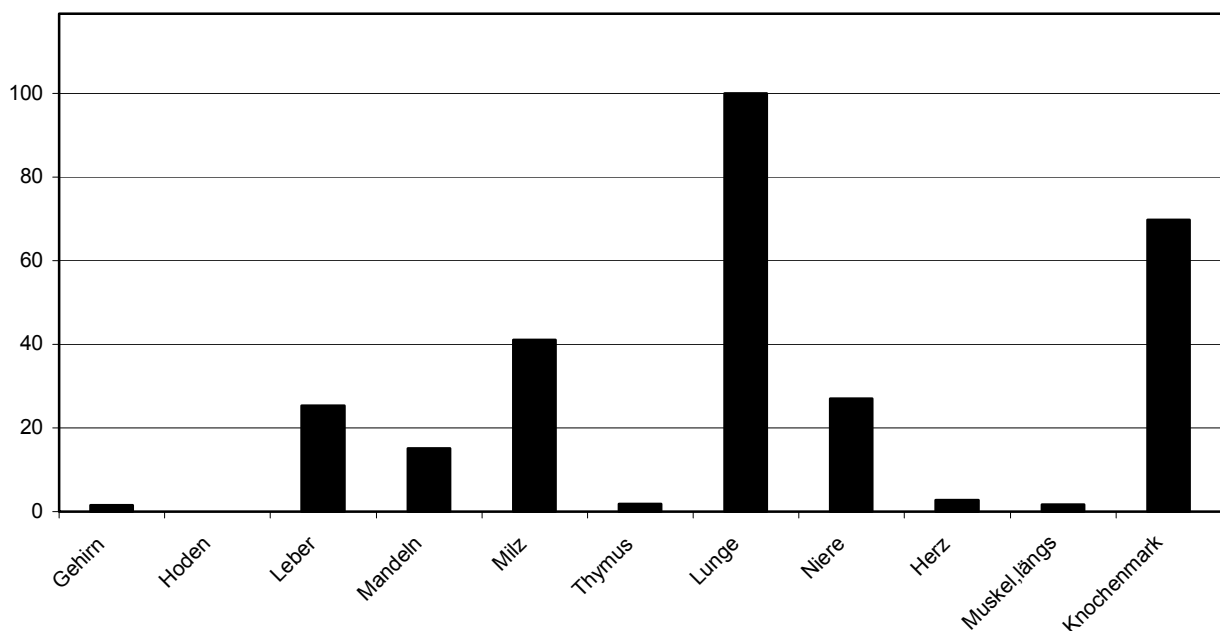


Abbildung 22: Expressionsmuster verschiedener Organe aus dem Kaninchen mit Hilfe der RT-PCR. Die hier dargestellten Daten beziehen sich auf Rcd-1 und sind auf die Werte für β -Actin normiert

In Abbildung 21 sind die ermittelten Bandenintensitäten nach der PCR für c-Myb dargestellt. Das Expressionsmuster von c-Myb zeigt in den Organen Milz, Leber und Lunge eine besonders hohe Expression. Im Knochenmark und der Niere lässt sich ebenfalls die Expression von c-Myb nachweisen, allerdings ist sie in diesen Organen um mehr als die Hälfte geringer. Noch geringere Expression wurde in der Herzmuskulatur gefunden. In den anderen untersuchten Organen Gehirn, Mandeln, Hoden, Thymus und längsgestreifter Muskel lässt sich dagegen nur geringe beziehungsweise keine c-Myb Expression nachweisen.

Bei einem Vergleich der Expression von c-Myb mit der von Rcd-1 fällt zunächst auf, dass Rcd-1 ebenfalls in besonders großen Mengen in der Lunge und im Knochenmark vorkommt. Aber auch in der Leber, der Niere und in der Milz lässt sich Rcd-1 Expression nachweisen, wie sie auch bei c-Myb gefunden wurde. Die für Rcd-1 in den Mandeln gefundene Expression dagegen konnte für c-Myb nicht beobachtet werden. Die geringe Expression für c-Myb in der Herzmuskulatur konnte hingegen für Rcd-1 nicht bestätigt werden. Für beide Proteine übereinstimmend wurde in den Organen Gehirn, den Hoden, dem Thymus und der längsgestreiften Muskulatur keine oder nur sehr geringere Expression gefunden.

Die Expressionsmuster von c-Myb und Rcd-1 zeigen auffallend viele Übereinstimmungen. Besonders starke Expression lässt sich für beide Proteine in solchen Organen finden, die wie das Knochenmark an blutbildenden Prozessen beteiligt sind, aber auch in Organen, in denen Differenzierung von Blutbestandteilen oder Abbau von Blutzellen, zum Beispiel Milz und Leber, stattfindet. Es ist bekannt, dass c-Myb im vaskulären System eine wichtige Rolle spielt. Dies könnte der Grund für die hohe Expression der beiden Proteine in der Lunge sein. Denn dieses Organ ist besonders reich an Blutgefäßen, die für eine besonders intensive Durchblutung sorgen. In Gehirn oder Muskulatur lässt sich dagegen kaum Rcd-1 oder c-Myb nachweisen, da diese keine Aufgaben bei Blutbildungsprozessen haben.

3.1.6 Reporterassays mit c-Myb und Rcd-1

Die Arbeit mit dem Reporterassay bietet dem Anwender eine Vielzahl von Möglichkeiten, die Interaktion verschiedener Transkriptionsfaktoren in einer Zelle zu untersuchen. Der größte Vorteil des Systems ist dabei, dass die Versuche in lebenden Zellen durchgeführt werden, so dass die Transkriptionsfaktoren ihre Funktion *in vivo* ausüben können. Allerdings werden die Versuche in der Zellkultur mit stabilen Zelllinien durchgeführt, so dass hierbei immer noch deutliche Abweichungen zu Prozessen, die in Gewebeverbänden stattfinden, auftreten können. Dies muss bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden. Ein weiterer Nachteil ist die extreme Empfindlichkeit der Messungen gegen veränderte Versuchsbedingungen wie Temperatur, Zelldichte oder Pipettierfehler. Bei der Durchführung muss auf exakt gleiche Bedingungen geachtet werden, da kleinste Abweichungen von dem Standard-Protokoll zu stark veränderten Messwerten führen können. In den hier dargestellten Versuchen wurden daher immer Mehrfachtests mit mindestens drei Wiederholungen durchgeführt.

3.1.6.1 Dosisabhängige Wirkung von Rcd-1 auf den *mim-1* Promotor

Um eine mögliche Kooperation der beiden Faktoren c-Myb und Rcd-1 zu untersuchen, wurden Kotransfektionen der eukaryontischen Expressionsvektoren pcDNAMyb und pcDNARcd durchgeführt. Als Reporterassay diente das Plasmid pmim-1-Luc, welches den *mim-1* Promotor für c-Myb mit einem darauf folgenden Luciferase-Gen enthält. Für die Versuche wurden pro Ansatz jeweils 1 µg DNA eingesetzt, die in unterschiedlichen Verhältnissen zu den Zellen gegeben wurde. Die hier beschriebenen Versuche wurden sowohl mit Tsa 3pG Zellen, als auch mit Cos 7-Zellen durchgeführt. Nach Transfektion (siehe 2.3.3) und Inkubation für 48 Stunden, wurden die Zellen geerntet, ein β -Galaktosidase-Assay und ein Luciferase-Assay durchgeführt. Die auf β -Galaktosidase normierten Daten sind in Abbildung 23 dargestellt. Diese Daten wurden für die Tsa 3pG Zellen erhalten, die Daten für die Cos 7-Zellen waren nahezu identisch, mit dem Unterschied, dass die relative Lumineszenz der Proben niedriger lag, was spezifisch für die jeweilige Zelllinie ist (Cos 7 Daten nicht dargestellt).

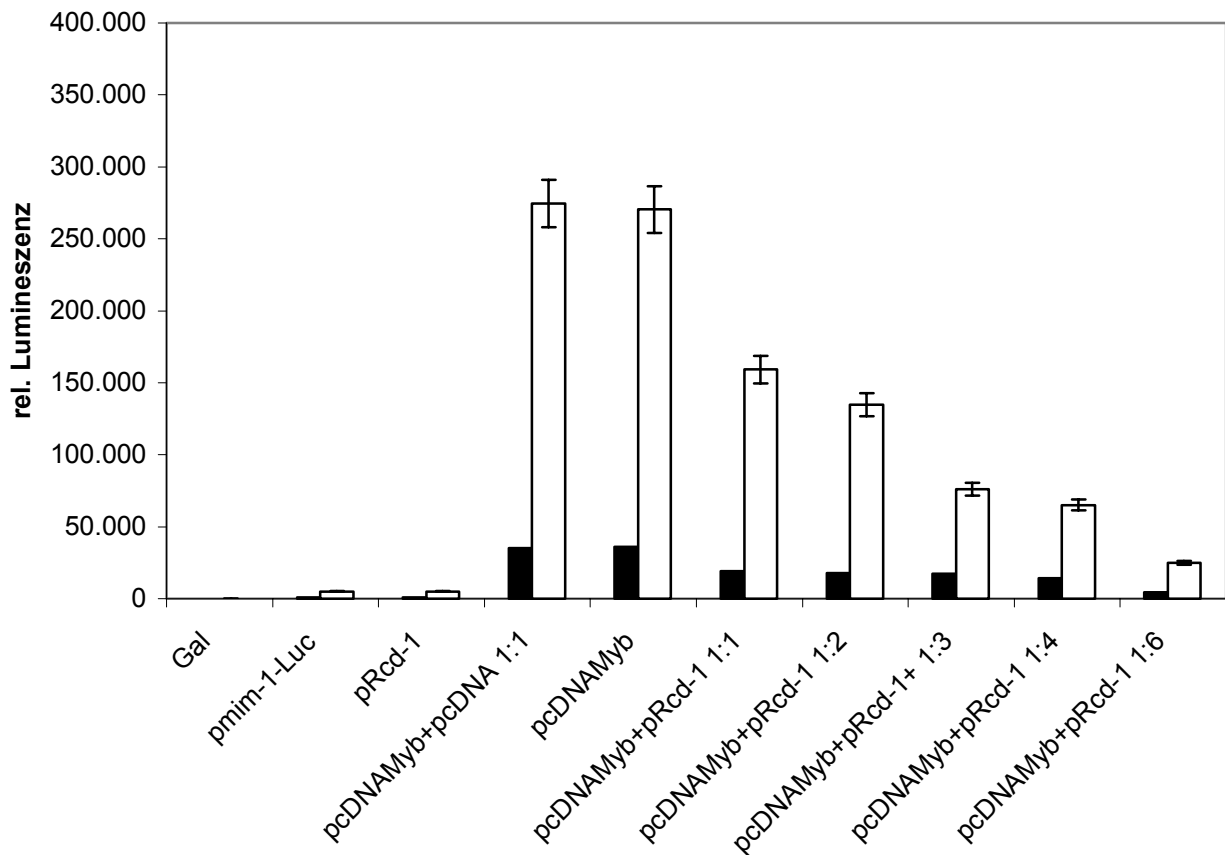


Abbildung 23: Dargestellt ist relative Lumineszenz am *mim-1* Promotor in Abhängigkeit von c-Myb und Rcd-1. Die schwarzen Balken stellen die Messwerte, die weißen die auf β -Galaktosidase normierten Werte dar

In Abbildung 23 ist die dosisabhängige Hemmung des c-Myb-Signals durch Rcd-1 dargestellt. Ganz links sind Transfektionen mit β -Galaktosidase bzw. β -Galactosidase und pmim-1-Luc-Reportergen dargestellt. Diese Proben zeigten keine Luziferaseaktivität. Auch die Kotransfektion von pmim-1-Luc mit pcDNARcd1 beziehungsweise pcDNA1.1 (vergleiche 2.3.8) ergab, dass diese Vektoren den *mim-1* Promotor nicht aktivieren. Nur die Kotransfektion mit pcDNAMyb führte zu einer deutlichen Aktivierung des Promotors. Diese Aktivierung wird durch Kotransfektion mit pcDNA nicht gehemmt. Wird dagegen pcDNARcd in steigenden Verhältnissen kotransfiziert, kann man eine zunehmende Hemmung der Luziferase-Aktivität mit steigendem Rcd-1 Anteil erkennen.

Die Aktivierung am *mim-1* Promotor durch c-Myb konnte durch CEBP β ebenfalls dosisabhängig gesteigert werden (Daten nicht dargestellt).

3.1.7 Rcd-1 im Mercury-Pathway Profiling-System

Das Mercury-Pathway Profiling-System der Firma Clontech wurde eingesetzt, um Aussagen über die Signaltransduktionswege, an denen Rcd-1 beteiligt ist, treffen zu können. Das Mercury-System besteht aus verschiedenen Luziferase-Vektoren, die unterschiedliche Promotoren tragen. Jeder Vektor mit seinem spezifischen Promotor repräsentiert einen bestimmten Signaltransduktionsweg. Die Kotransfektion dieser Transkriptionsfaktoren mit einem Expressionsvektor für Rcd-1 ermöglicht es daher, die Interaktion des Faktors in den unterschiedlichen Signaltransduktionswegen zu untersuchen. Abbildung 24 zeigt dies für das Protein Rcd-1.

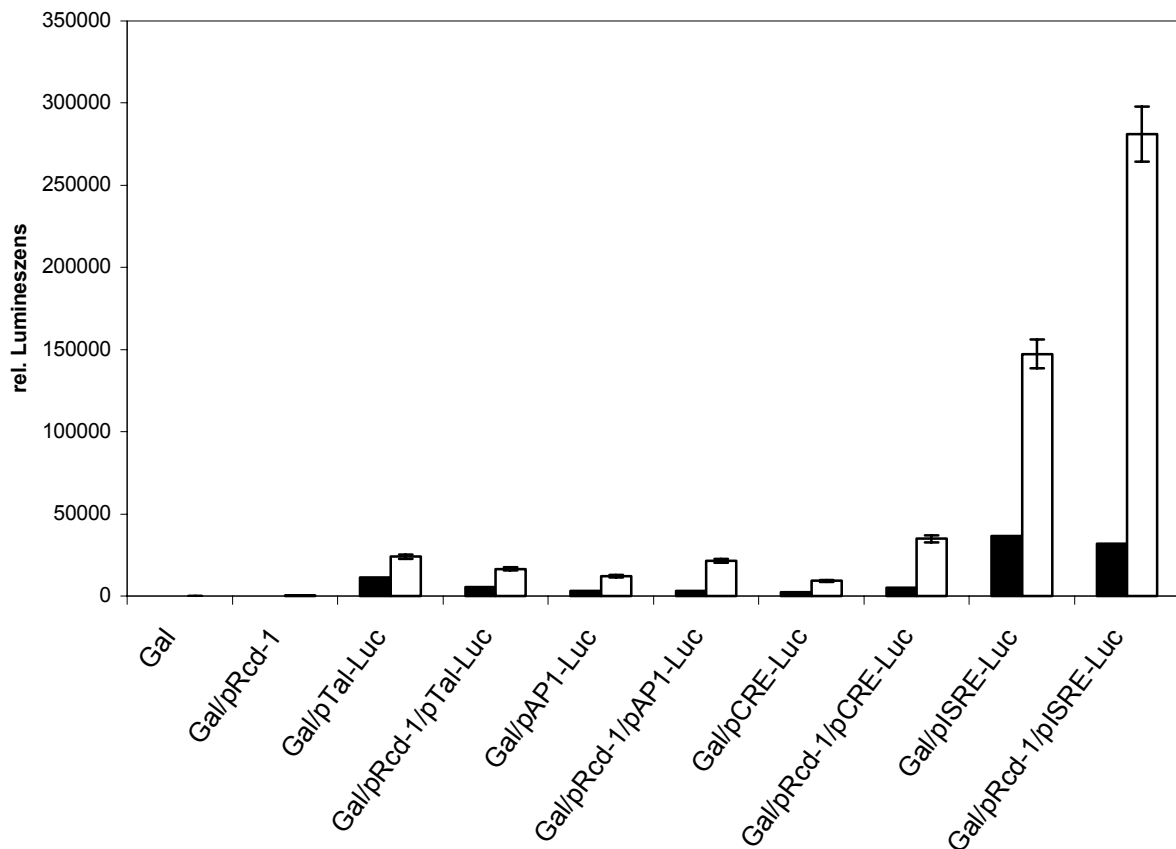


Abbildung 24: Daten des Mercury-Pathway Profiling-Systems für die Luziferase-Vektoren mit und ohne Rcd-1. Die schwarzen Balken stellen die Messwerte, die weißen die auf β -Galaktosidase normierten Werte dar

Die Versuche wurden nach Clontech Vorschrift in 60 mm Schalen mit jeweils 2×10^5 Tsa 3pG Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden wie unter 2.3.3 beschrieben transfiziert und nach 48 Stunden die Luziferase- und β -Galaktosidase-Werte ermittelt.

Wie in Abbildung 24 zu erkennen konnte für AP-1, CRE (*cAMP response element*) und ISRE (*Interferon stimulated response element*) jeweils eine Zunahme der Promotor-Aktivität beobachtet werden, während das Kontrollplasmid pTal-Luc nach Rcd-1-Transfektion ein niedrigeres Luziferase Signal zeigte.

3.1.8 Bindung von Rcd-1 an DNA-Zellulose

Um die Bindung von Rcd-1 an DNA zu testen, wurden Bindungsassays an doppelsträngiger DNA-Zellulose (Sigma) durchgeführt (2.6.3). Die aufgefangenen Elutions-Fractionen wurden auf einem Laemmligel aufgetrennt, gefärbt und die Intensität der Banden mit *WinEasy* quantifiziert. Abbildung 25 zeigt das Elutionsprofil von Rcd-1 bei steigender Salzkonzentration.

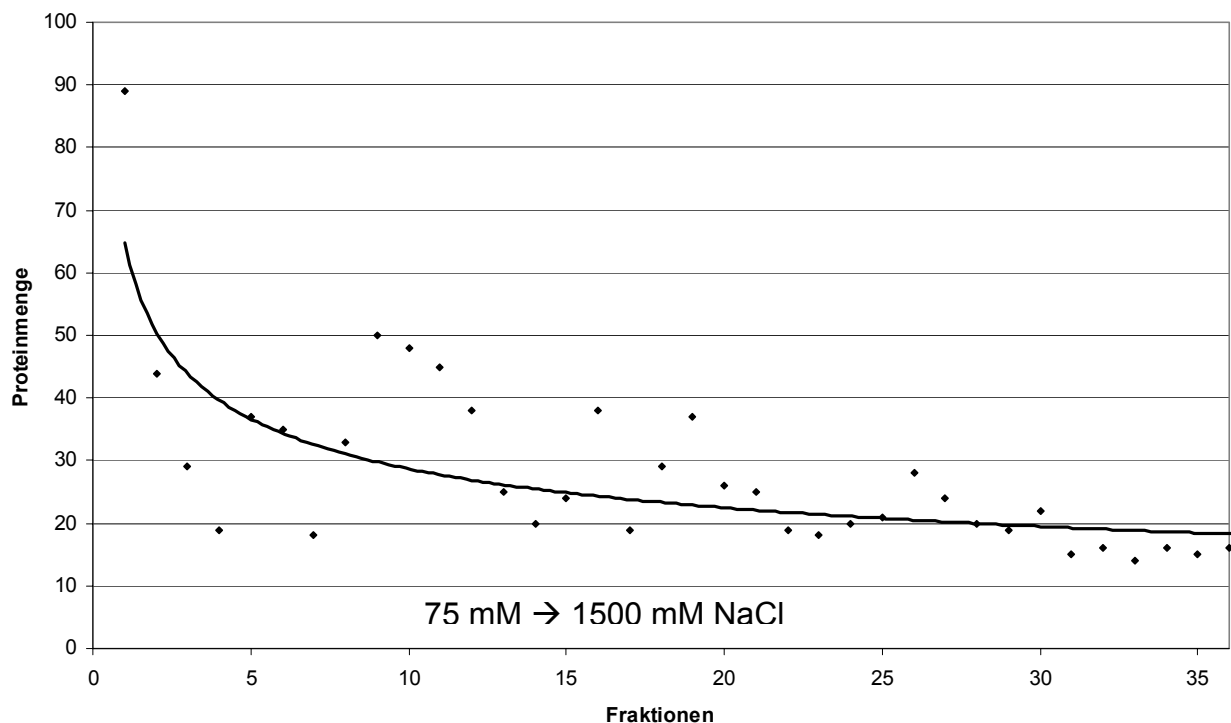


Abbildung 25: Bindung von Rcd-1 an DNA-Zellulose. Dargestellt ist die Elution durch steigende Salzkonzentrationen

Rcd-1 eluiert kontinuierlich über den gesamten Salzgradienten. Rcd-1 ist daher nicht in der Lage, die DNA spezifisch zu binden. Die Aktivierung des *mim-1* Promotors wird offenbar durch Protein-Proteinwechselwirkungen hervorgerufen.

3.1.9 Fluoreszenzmikroskopie von RFP markiertem CCR4

In Hefe liegt Rcd-1 als Teil des CCR4-Not-Komplexes vor, von dem bereits einige Komponenten in Säugerzellen nachgewiesen wurden. Um die Frage zu klären, ob ein solcher Komplex auch in humanen Zellen vorliegt, sollte die Lokalisation von CCR4 in Tsa 3pG Zellen ermittelt werden. Hierfür wurde CCR4 mit *red fluorescent protein* (RFP) markiert. Die CCR4 Sequenz wurde freundlicherweise von Takahiro Nagase vom Kazusa DNA Research Institute zur Verfügung gestellt. CCR4 wurde mit den Primern Ccr4dsred5' und Ccr4dsred3' amplifiziert und über *KpnI* und *BamHI* Vektor pDsRed1-N1 kloniert (CCR4-RFP).

Als Kontrolle wurde pDsRed1-N1 Wildtyp transfiziert. Der Versuchsablauf erfolgte wie unter 2.3.7 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 zu sehen.

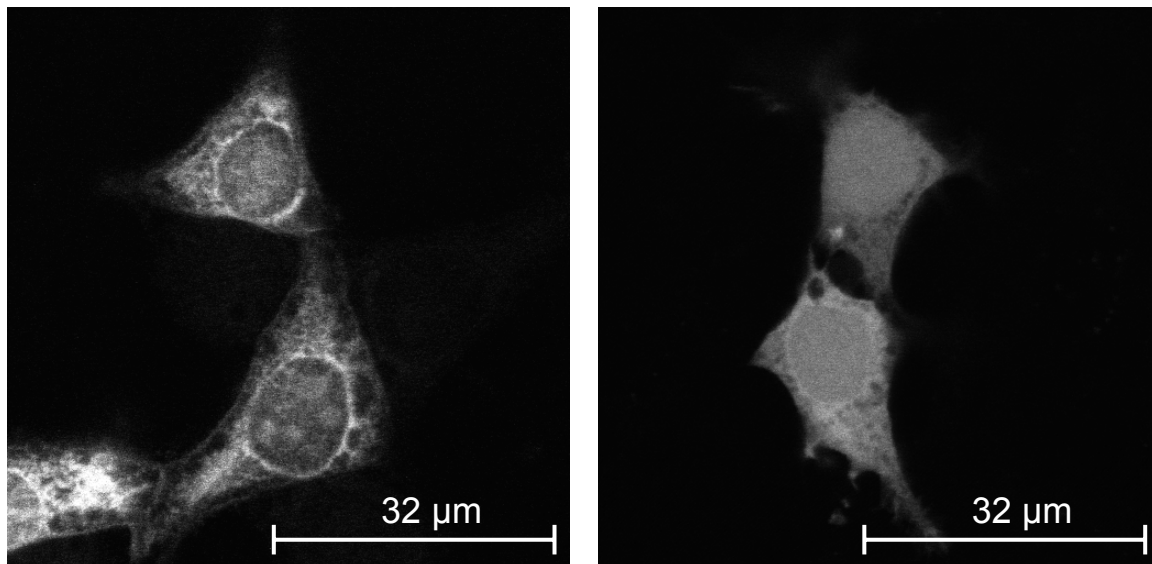


Abbildung 26: Links dargestellt sind TSA 3pG Zellen mit dsRed-Wildtyp, rechts sind Zellen mit dem CCR4-RFP-Fusionsprotein abgebildet

In den dsRed-Wildtyp transfizierten Zellen ist RFP hauptsächlich an der Kernmembran angelagert. Im Cytosol und Kern ist nur wenig Farbstoff zu erkennen. In den Zellen, die das CCR4-RFP-Fusionsprotein enthalten, ist die Fluoreszenz auf

die gesamte Zelle verteilt. Offenbar kommt CCR4, ebenso wie Rcd-1, nicht bevorzugt in einem bestimmten Kompartiment der Zelle vor. Kotransfektionen mit CCR4-RFP und Rcd-1-GFP-Fusionsproteinen bestätigten dieses Ergebnis (Daten nicht dargestellt).

3.2 Weitere Kofaktoren

Um die Funktion von c-Myb besser zu verstehen, sollten möglichst viele Kofaktoren des Transkriptionsfaktors bekannt sein. Daher war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, bisher noch nicht bekannte Kofaktoren von c-Myb zu identifizieren und ihre Wechselwirkung mit c-Myb zu charakterisieren. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde das *Two-Hybrid*-System eingesetzt. Untersucht wurde die Wechselwirkung von c-Myb AS530-635 mit einer cDNA-Bibliothek aus der Maus vom Tag 11 der Entwicklung. Einige Arbeitsschritte des *Two-Hybrid-Screenings* wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. André Schürmann durchgeführt.

3.2.1 Ablauf des *Two-Hybrid-Screenings*

1. Klonierung des GAL4-DNA-BD/Köderkonstruktes
2. Transformation von Y190 und Überprüfung des Köderkonstruktes auf autonome Transkriptionsaktivität und Zelltoxizität
3. Amplifikation der cDNA-Bibliothek
4. Transformation der Bibliotheksplasmide
5. Ausplattieren der Kotransformanten auf SD/-His/-Leu/-Trp-Medium für HIS3-Expressionstest
6. β -Galaktosidase-Test mit His⁺-Klonen
7. Eliminierung falsch-positiver Klone
8. Isolierung und Identifizierung der Bibliotheksplasmide
9. Verifizierung positiver *Two-Hybrid*-Interaktionen

3.2.2 Transformation des Köderkonstruktes in Y190

Das Köderkonstrukt mit den Aminosäuren 530-636 aus Maus c-Myb in pAS2-1 lag zu Beginn der Arbeiten vor. Mittels Elektroporation wurde das Köderplasmid in den Hefestamm Y190 transformiert. Mittels PCR wurde überprüft, ob die Hefen das Plasmid aufgenommen haben. Als Primer wurde eine auf dem Gal4-Gen (Gal 4 Forward) und eine auf dem Insert (2861) liegende Sequenz gewählt. Da der Y190-Stamm zu einer unkontrollierten Histidin-Expression neigt, wurde diese Expression durch Zugabe von 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) unterdrückt. Um die optimale 3-AT Konzentration zu ermitteln, wurden SD-T-H Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen von 5 bis 60 mM 3-AT vorbereitet und die transformierten Hefen für 4 Tage bei 30°C auf den Platten inkubiert. Bei einer Konzentration von 15 mM 3-AT zeigten die Hefen nur noch sehr schwaches Wachstum, daher wurde diese Konzentration für die weiteren Arbeitsschritte gewählt. Anschließend wurde mittels der Lithiumacetat-Methode (siehe 2.2.4) die Maus-Bibliothek (Mäuseembryo-cDNA-Bibliothek, Swiss Webster, 11. Tag der Gestation in pGAD10, Firma Clontech) in die Hefezellen transformiert und die transformierten Zellen auf SD-H-L-T Platten ausplattiert und acht Tage inkubiert. Die Kolonien wurden anschließend auf frische SD-H-L-T Platten übertragen. Nach sechs Tagen wurde ein β -Galaktosidase-*colony-lift*-Filter-assay durchgeführt (siehe 2.2.6). Dabei zeigten elf der Kolonien eine Blaufärbung an. Von den so erhaltenen positiven Klonen wurden die Plasmide präpariert und sequenziert.

Vier dieser Klone konnten nicht Sequenziert werden, da sich mit dem Sequenzierprimer kein Produkt ergab. Die anderen konnten mit dem in der Vorschrift angegebenen primer Gal 4 Forward sequenziert werden. Durch Datenbankanalyse konnten folgende Proteine oder homologe Proteine identifiziert werden (vergleiche Tabelle 6):

Tabelle 6: Proteine aus dem *Two-Hybrid* Screening

<i>Klon</i>	<i>Protein</i>	<i>Genbank-Nummer</i>
1	Scmh1 (Sexcomb on midleg homolog protein) (Maus)	AB030906
2	Dlxin-1/ Mage-D1 (Maus)	AB029448
3	Protein- Tyrosin Phosphatase (Maus)	Q62136
4	5qNCA (human)	AF338242
5	LYST-interactin protein (human, partial)	AF141344

Die weiteren Versuche zu den potentiellen Kofaktoren von c-Myb finden sich in den nächsten Kapiteln.

3.2.3 Untersuchungen von Sexcomb on midleg

Dieses ursprünglich in *Drosophila melongaster* entdeckte Protein gehört zu der Gruppe der sogenannten *Polycomb*-Gene, die für die Regulation homeotischer Gene während der Embryogenese zuständig sind. Im *Yeast-Two-Hybrid* Screen wurde das homologe Protein der Maus gefunden.

Zunächst wurde das Expressionsmuster des Proteins RT-PCR ermittelt (vergleiche 3.1.5).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt.

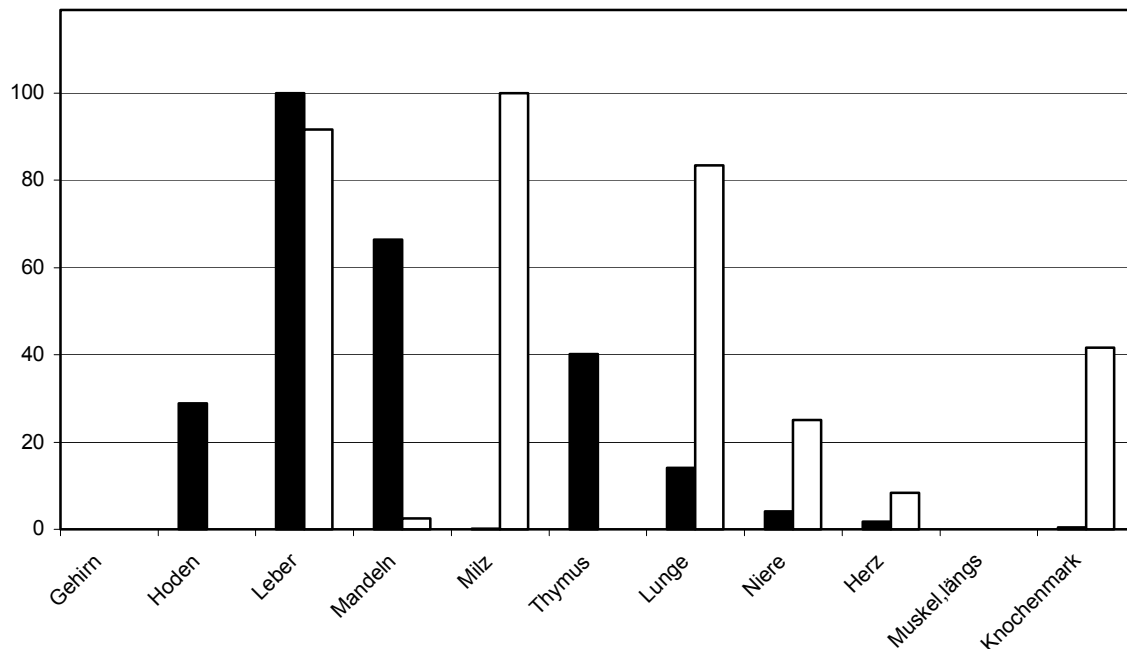


Abbildung 27: Expressionsmuster verschiedener Organe aus Kaninchen mit Hilfe der RT-PCR. Die hier dargestellten Daten beziehen sich auf Sexcomb on midleg und sind auf die Werte für β -Actin normiert. In weiß sind die Werte für c-Myb aus 3.1.5 dargestellt

In Abbildung 27 ist das Expressionsmuster von Sexcomb on midleg zu sehen. Im Vergleich mit dem von c-Myb ist zu erkennen, dass eine übereinstimmende Expression nur in der Leber stattfindet. In den längsgestreiften Muskeln, dem Herz und dem Gehirn ist bei beiden Proteinen nur sehr geringe Expression zu erkennen.

Im Gegensatz zu *c-Myb* ist *Sexcomb on midleg* in den Mandeln, dem Thymus und in den Hoden mehr vorhanden.

Um Aussagen über Wechselwirkung *in vivo* treffen zu können, wurde die Sequenz für *Sexcomb on midleg* mit den *primern* *Sexc1* und *Sexc2* amplifiziert und in den Vektor pcDNA1.1Amp kloniert. Dieser eukaryontische Expressionsvektor wurde anschließend für Reporterassays in Wechselwirkung mit *c-Myb* am *mim-1* Promotor benutzt.

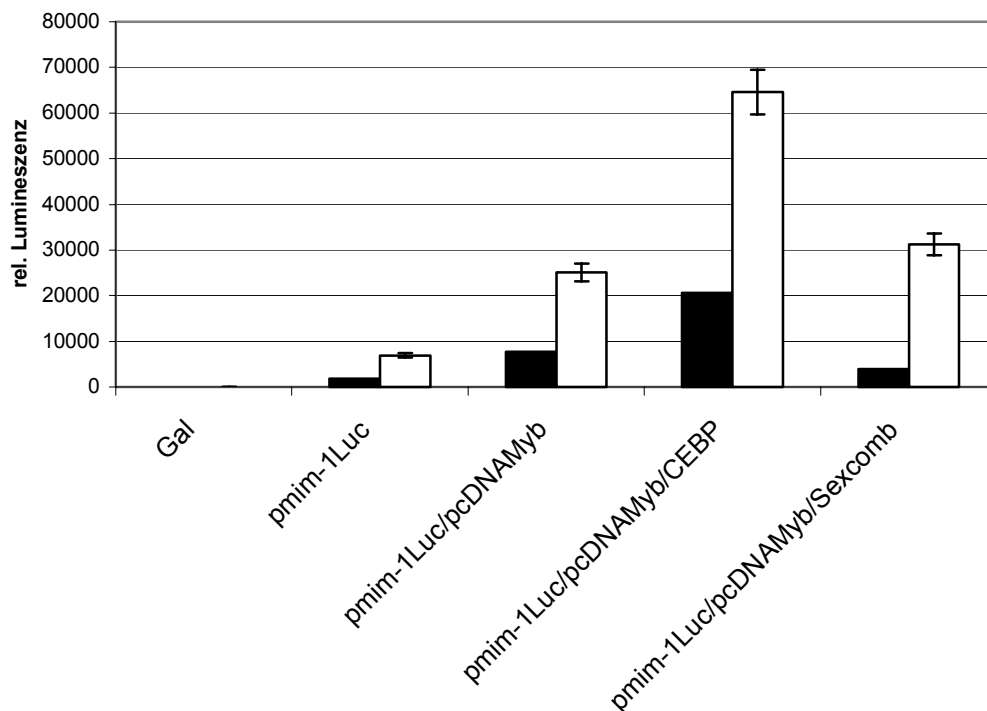


Abbildung 28: Relative Lumineszenz am *mim-1* Promotor in Abhängigkeit von *c-Myb* für *Sexcomb* beziehungsweise *CEBP* (Positivkontrolle). Die schwarzen Balken stellen die Messwerte, die weißen die auf β -Galaktosidase normierten Werte dar

Im Reporterassay konnte eine leichte Zunahme der Luziferaseaktivität beobachtet werden, die allerdings zu gering ist, um eindeutige Aussagen treffen zu können, da sie sich im Bereich des Messfehlers befindet.

Aufgrund der fehlenden Wechselwirkung *in vivo* und der unterschiedlichen Expressionsmuster wurde auf weitere Versuche mit *Sexcomb on midleg* verzichtet.

3.2.4 Untersuchung von Dlxin-1

Der zur Familie der *Melanoma* assoziierten Antigene (MAGE) zählene Faktor Dlxin-1 steuert den Zellzyklus und reguliert die Bildung des Knochenmarks. Dabei reguliert er die Aktivität von Dlx5, welches eine wichtige Rolle bei der Knochenbildung und -heilung spielt (Miyama *et al.*, 1999). Das Protein wird vor allem während der Embryogenese in Osteoblasten gebildet (Masuda *et al.*, 2001). Dlxin-1 ist ein 775 Aminosäuren großes Protein.

Das Expressionsmuster von Dlxin-1 wurde analog zu c-Myb und Rcd-1 ermittelt (siehe 3.1.5).

In Abbildung 29 sind die Ergebnisse dargestellt.

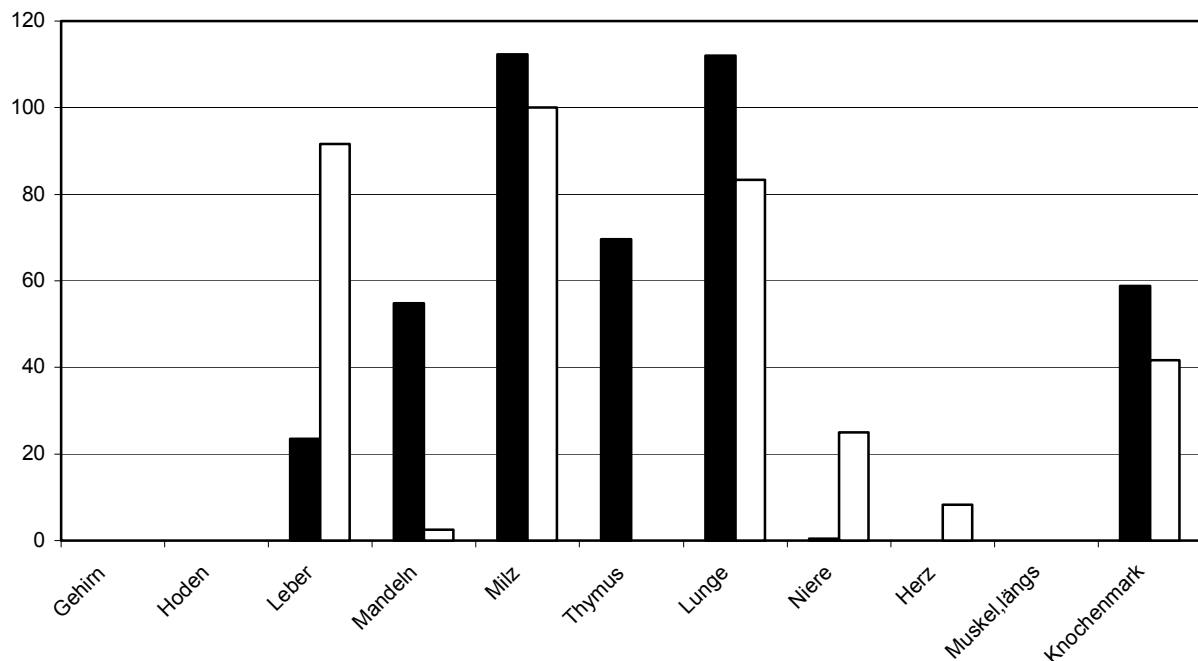


Abbildung 29: Expressionsmuster verschiedener Organe aus Kaninchen mit Hilfe der RT-PCR. Die hier dargestellten Daten beziehen sich auf Dlxin-1 und sind auf die Werte für β -Actin normiert. In weiß sind die Werte für c-Myb aus 3.1.5 dargestellt

Das Expressionsmuster zeigt hohe Konzentrationen von Dlxin-1 in Milz, Lunge und Knochenmark. Dies ist eine deutliche Übereinstimmung zu c-Myb, das in den genannten Organen sowie in der Leber die höchsten Expressionsraten zeigte. Auch in der Leber ist Dlxin-1 vorhanden, wenn auch in geringeren Mengen. Im Gegensatz zu c-Myb wurde dagegen ein hoher Expressionsanteil in den Mandeln und dem Thymus gefunden. Diese Daten lassen eine Wechselwirkung der beiden Proteine in einigen Organen möglich erscheinen.

Um dies zu verifizieren, wurde Dlxin-1 Sequenz mit den Primern 5'Dlxin und 3'Dlxin auf Milz cDNA amplifiziert und über *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pcDNA1.1 kloniert. Anschließend wurde der Dlxin-1-Expressionsvektor im Reporterassay untersucht (siehe Abbildung 30).

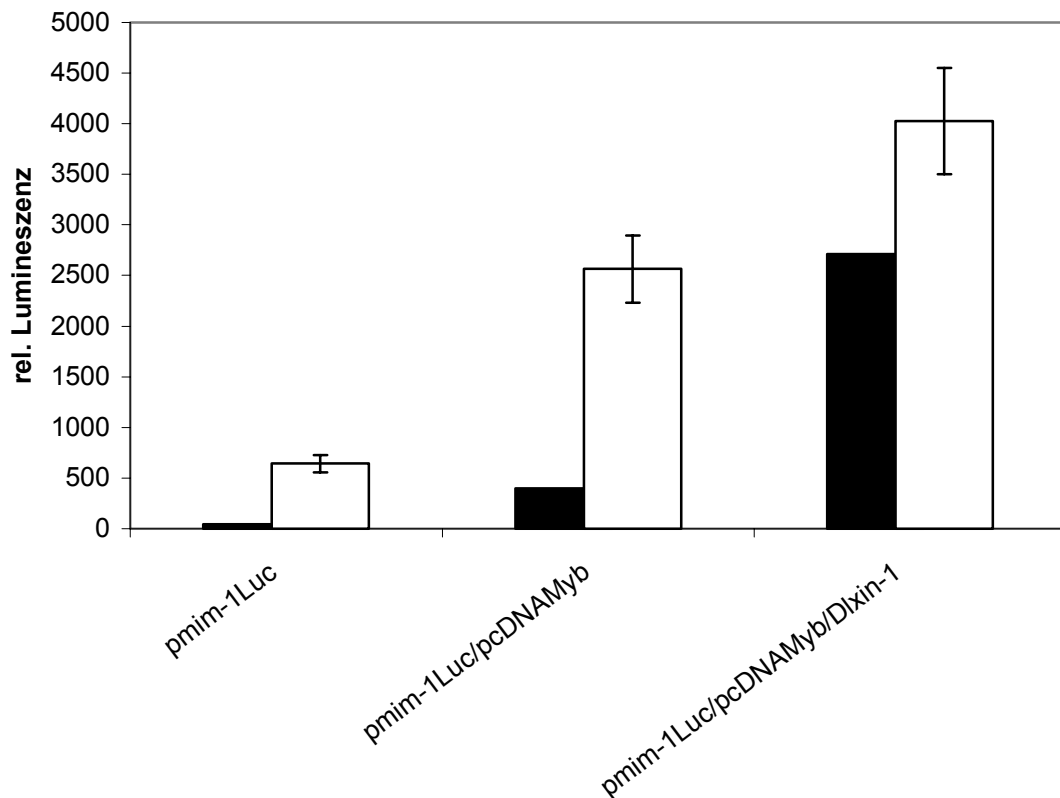


Abbildung 30: Reporterassay am *mim-1* Promotor mit c-Myb und Dlxin-1. Die schwarzen Balken stellen die Messwerte, die weißen die auf β -Galaktosidase normierten Werte dar

Im Reporterassay konnte eine leichte Erhöhung der Promotoraktivität nachgewiesen werden.

Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass Dlxin-1 ein möglicher Kofaktor von c-Myb ist. Auf weitere Studien über die Art der Wechselwirkung von c-Myb und Dlxin-1 wurde aus Zeitgründen verzichtet.

3.2.5 Untersuchungen mit der Tyrosinphosphatase

Im *Two-Hybrid-Screening* wurde auch eine Tyrosinphosphatase gefunden. Ihre Aufgabe in der Zelle ist jedoch bis jetzt unklar.

Zunächst sollte die vermutete Wechselwirkung im *Phage-Display* bestätigt werden. Dazu wurde die Sequenz der Tyrosinphosphatase, die freundlicherweise von Prof. Fujita (Tokyo, Japan) zur Verfügung gestellt wurde, in drei Abschnitte (Typ1=AS128-909, Typ2=AS501-945 und Typ3=AS 909-1280) unterteilt und in pcDNA1.1 kloniert. Damit wurde anschließend ein Phage-Display durchgeführt (vergleiche 2.4). Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt.

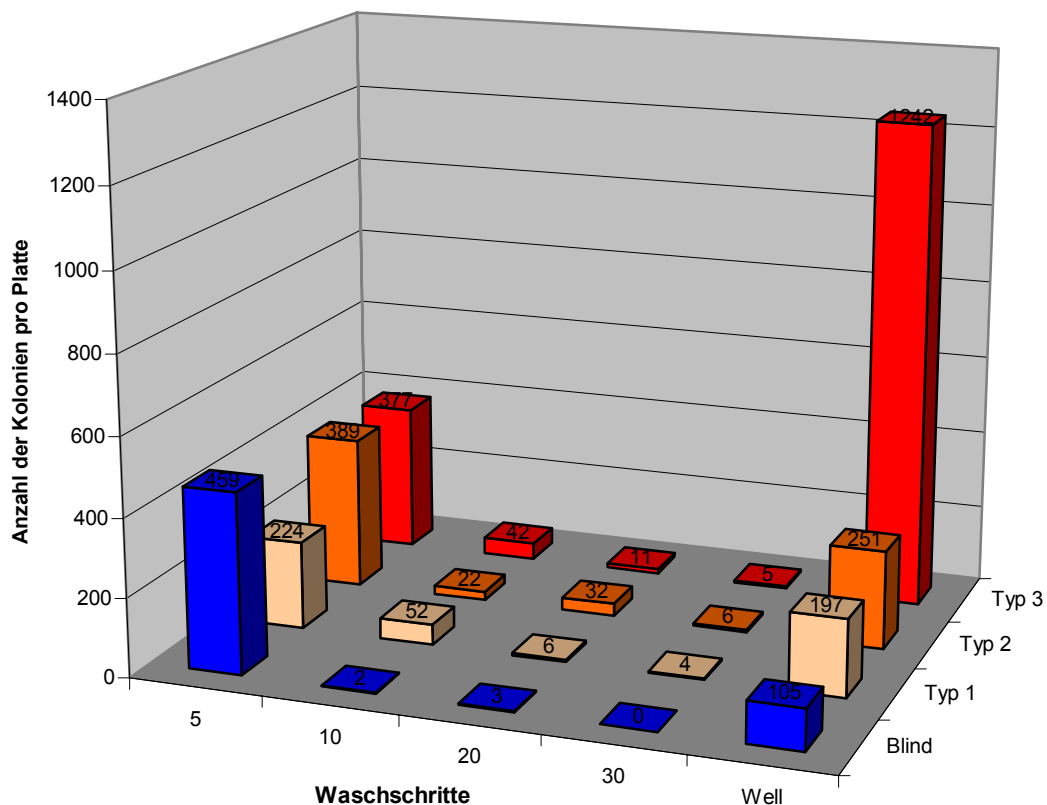


Abbildung 31: Ergebnisse des *Phage-Displays*. Als Kontrolle diente BSA (Blind). Die Tyrosinphosphatase wurde in drei Bereiche gegliedert. Typ1= AS128-909, Typ2=AS501-945 Und Typ3=AS 909-1280.

Nachdem im *Phage-Display* eine Wechselwirkung zwischen c-Myb und dem C-terminalen Bereich der Tyrosinphosphatase gefunden wurde, sollte die Frage nach einer möglichen Beeinflussung von oder durch c-Myb geklärt werden. Dafür wurde die Tyrosinphosphatase in den Vektor pcDNA1.1 kloniert und in Reporteragenassays am *mim-1* Promotor mit c-Myb eingesetzt (siehe Abbildung 32).

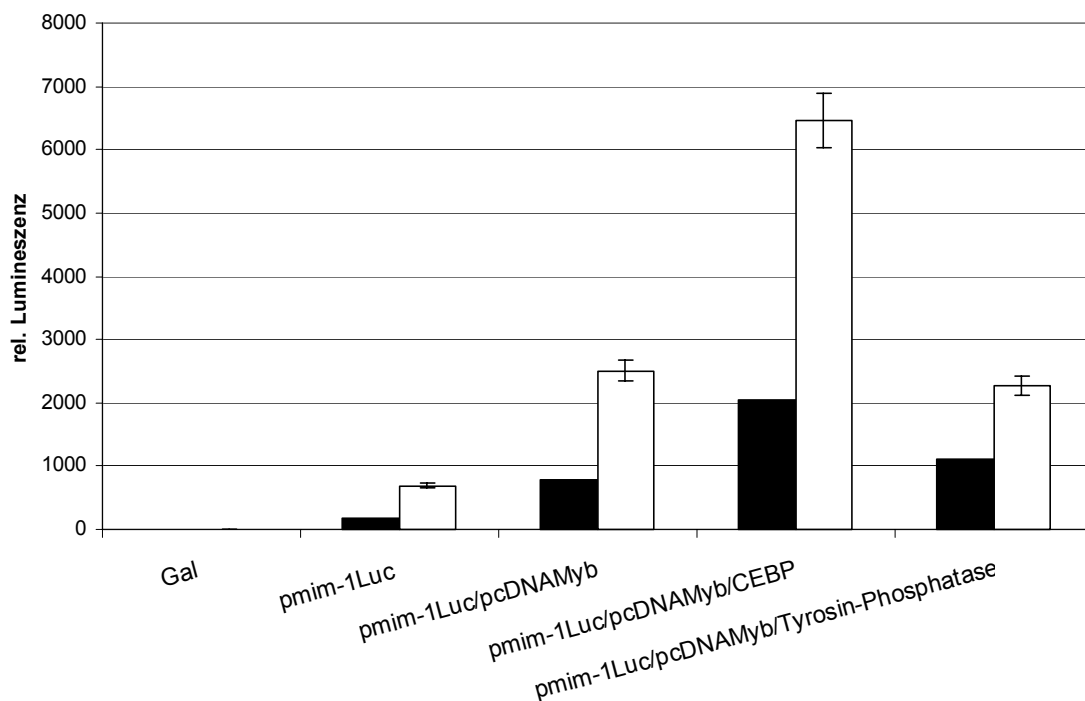


Abbildung 32: Reporteragenassay am *mim-1* Promotor mit c-Myb und der Tyrosin-Phosphatase. Die schwarzen Balken stellen die Messwerte, die weißen die auf β -Galaktosidase normierten Werte dar

Im Reporteragenassay konnte keine Veränderung der Promotoraktivität nachgewiesen werden, daher wurde auf weitere Versuche mit der Tyrosinphosphatase verzichtet.

3.2.6 Untersuchungen mit 5qNCA

Dieses kernständige Protein wurde zuerst als Tumorsuppressor bei Myelodysplasie (MDS) identifiziert (Hu *et al.*, 2001). 5qNCA ist ein humanes, 191 kDa großes Protein, das durch Chromosomenanalysen nach Deletion oder Verlust des Chromosoms 5 entdeckt wurde. Der Verlust oder die Deletion an Chromosom 5 ist häufig die Ursache von Krankheiten wie Myelodysplasie (MDS) oder der akuten

myeloiden Leukämie (AML). Dies legte die Vermutung nahe, dass in dem Chromosom 5 ein Tumorsuppressor exprimiert wird, dessen Verlust oder Deletion zu Krebs führen kann. Als möglicher Kandidat für diesen Tumorsuppressor wurde 5qNCA identifiziert. Das Protein enthält C-terminal einen Zink-Finger und eine jmjC-Domäne, die sich häufig in Proteinen befindet, die am Chromatinremodelling beteiligt sind. In Zelllinien, die Deletionen am Chromosom 5 aufweisen, führte eine Expression von 5qNCA zu einer Unterdrückung des Wachstums (Hu *et al.*, 2001).

Zunächst sollte die vermutete Wechselwirkung mit dem Phage-Display-System bestätigt werden. Dazu wurde die Sequenz von 5qNCA, die freundlicherweise von Carol Westbrook (Section of Hematology/Oncology, Department of Medicine, University of Illinois at Chicago, Illinois USA) zur Verfügung gestellt wurde, in mehrere Abschnitte unterteilt. Alle Versuche die Proteinfragmente oder das *full-length* Protein aufzureinigen schlugen jedoch fehl. Lediglich ein kleines Fragment des N-Terminus (Basenpaare 325-975) konnte als His-Fusionsprotein exprimiert und aufgereinigt werden.

Dieses Fragment wurde im Phage-Display-System auf seine Wechselwirkung mit c-Myb untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 33 dargestellt.

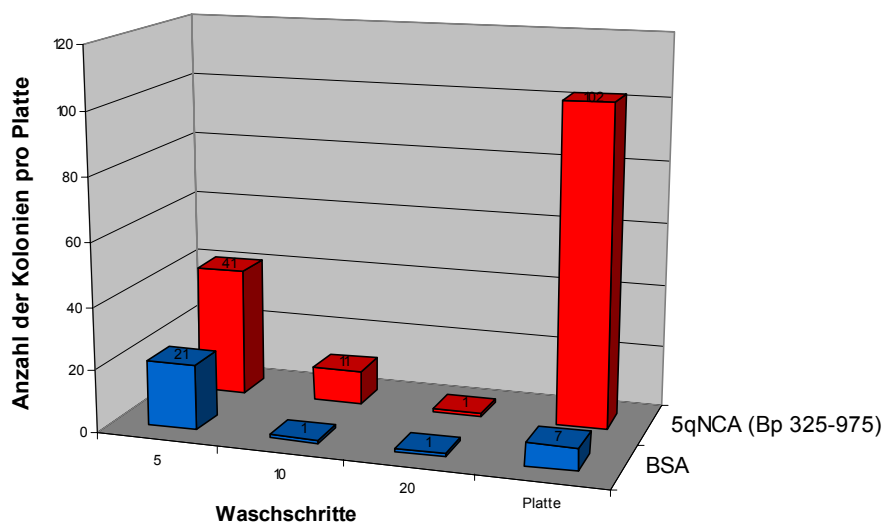


Abbildung 33: Das Phage-Display mit dem N-terminalen 5qNCA Fragment (Bp 325-975) zeigte mehr Kolonien auf der Platte, als die Kontrolle mit BSA

Im Phage-Display konnte für die Region Bp 325-975 von 5qNCA eine deutliche Wechselwirkung mit c-Myb nachgewiesen werden. Da es jedoch in *E.coli* nicht möglich war, andere Bereiche des Proteins in ausreichender Menge und Qualität zu exprimieren, wurde eine Kopräzipitation durchgeführt, um die Wechselwirkung des *full-length* Proteins mit c-Myb zu testen. Hierfür wurde ein mit *Flag tag* gekoppeltes 5qNCA verwendet. Für die Präzipitation wurden je 5 mg pFlag Sepharose (Sigma) abgewogen und mit den Zellextrakten inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend mit 10 ml PBS+0,5M NaCl gewaschen, auf einem Lammlig Gel analysiert und auf eine PVDF Membran beblottet, dann wurde mit einem spezifischen c-Myb Antikörper angefärbt. Das Ergebnis ist in Abbildung 35 zu sehen.

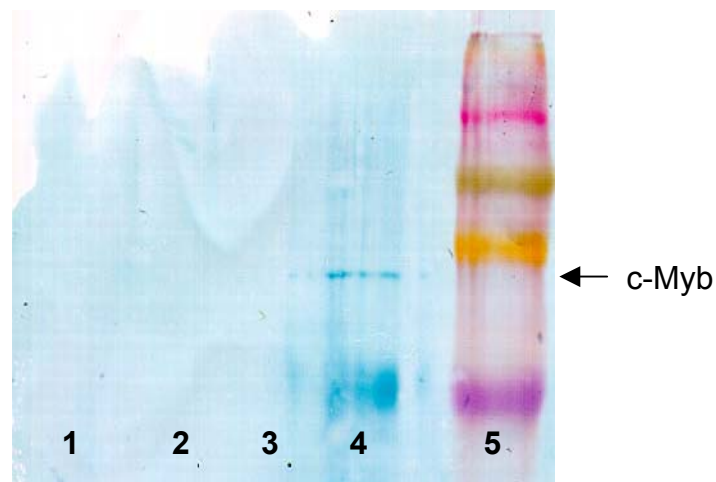


Abbildung 34: Kopräzipitation mit c-Myb und 5qNCA_{Flag}, gefärbt mit einem c-Myb Antikörper

1: Tsa 3pG Zellen; 2: CNBr-Sepharose mit c-Myb transfizierten Zellkernextrakten; 3: CNBr-Sepharose mit 5qNCA transfizierten Zellkernextrakten; 4: CNBr-Sepharose mit c-Myb und 5qNCA transfizierten Zellkernextrakten; 5: Rainbow-Marker

In der ersten *lane* sind die Kernextrakte der unbehandelten Tsa 3pG Zellen aufgetragen. Hier ist kein c-Myb angefärbt worden. In den *lanes* 2 und 3 sind mit c-Myb beziehungsweise 5qNCA transfizierten Zellkernextrakte aufgetragen. Auch hier ist kein c-Myb vorhanden, da es nicht an die pFlag Sepharose bindet. In der 4. Lane sind die Extrakte der mit c-Myb und 5qNCA kotransfizierten Zellen. Hier wurde c-Myb von dem Antikörper angefärbt. Die pFlag Sepharose bindet zunächst 5qNCA. c-Myb wird anschließend mit der Sepharose und 5qNCA kopräzipitiert. Der Rainbow-Marker in *lane* 5 dient als Längenstandard.

Nachdem mit dem Phage-Display und bei der Kopräzipitation eine deutliche Wechselwirkung zwischen dem N-terminalen 5qNCA Fragment und c-Myb nachgewiesen wurde, sollte ein Vergleich der Expressionsmuster gemacht werden,

um Aufschluss über die gemeinsame Rolle der beiden Proteine in den Zellen zu erhalten. Hierfür wurde wie unter 3.1.5 beschrieben mittels RT-PCR das Expressionsmuster ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 zu sehen.

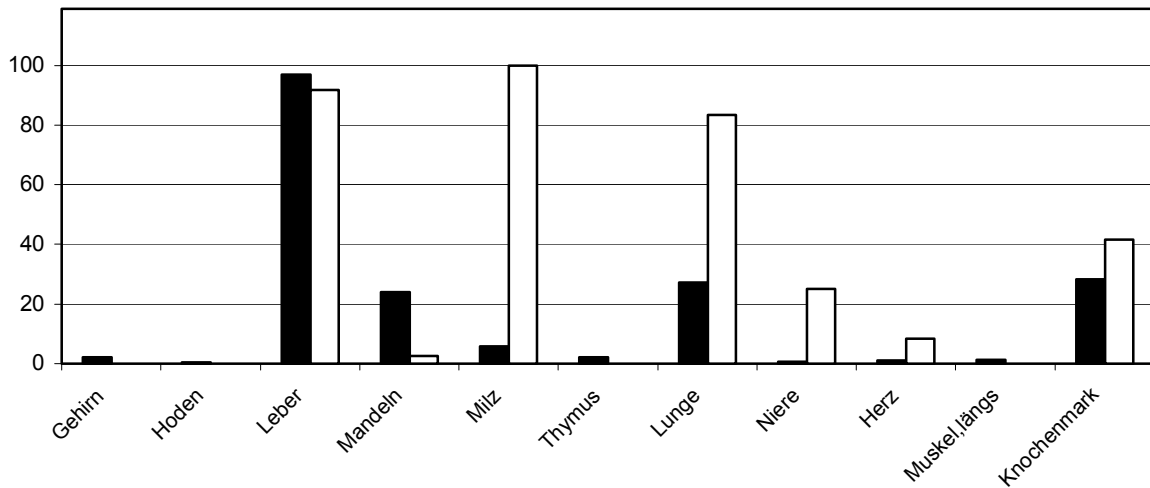


Abbildung 35: Expressionsmuster von 5qNCA verschiedener Organe aus Kaninchen mit Hilfe der RT-PCR. Die hier dargestellten sind auf die Werte für β -Actin normiert. In weiß sind die Werte für c-Myb aus 3.1.5 dargestellt

Die Expression von 5qNCA in Leber, Milz, Lunge und Knochenmark stimmt mit den für c-Myb gefundenen Daten überein. Nur die Expression in den Mandeln und die fast fehlende Expression in der Milz differieren.

Um eine Aussage über eine *in vivo* Aktivität treffen zu können, wurde mit 5qNCA und c-Myb ein Reporterassay durchgeführt. Hierfür wurde die Sequenz über *EcoRI* und *NotI* in pcDNA1.1 kloniert und wie unter 2.3.3 transfiziert und in den Versuchen eingesetzt. Abbildung 37 zeigt die ermittelten Werte.

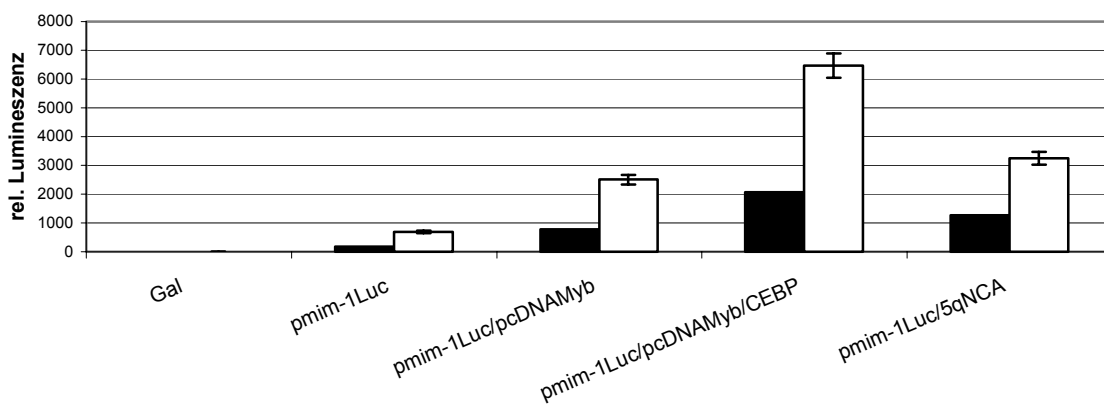


Abbildung 36: Reportergenassay am *mim-1* Promotor mit c-Myb und der 5qNCA. Die schwarzen Balken stellen die Messwerte, die weißen die auf β -Galaktosidase normierten Werte dar

Es konnte nur eine sehr geringe Zunahme der *mim-1* Promotoraktivität festgestellt werden. Zur endgültigen Klärung der Wechselwirkung zwischen 5qNCA und c-Myb bedarf es weiterer Experimente.

3.2.7 Weitere Yeast-Two-Hybrid Kofaktoren

Die im Two-Hybrid-Screen gefundenen Hefe-Proteine *Serin rich protein* und *Yeast Alcohol Dehydrogenase* wurde nicht für weitere Untersuchungen herangezogen, da es sich bei ihnen falsch positive Klone handelt.

Das LYST-interactin protein (human, partial) wurde nicht weiter untersucht, da die Funktion des Proteins als lysosomaler Regulator im Cytosol, der Funktion von c-Myb als Transkriptionsfaktor im Kern entgegensteht (Masui, et al. 2003).

3.3 Untersuchungen an und mit c-Myb

3.3.1 Mercury-Pathway-System

Auch c-Myb wurde mit dem *Mercury-Pathway-System* untersucht, um seine Rolle in einigen Signalkaskaden einzugrenzen. Die Durchführung entsprach der unter 2.3.3 beschriebenen. Die Versuche wurden sowohl in HEK 293 als auch in Cos 7-Zellen durchgeführt. Abbildung 37 zeigt die Daten für c-Myb.

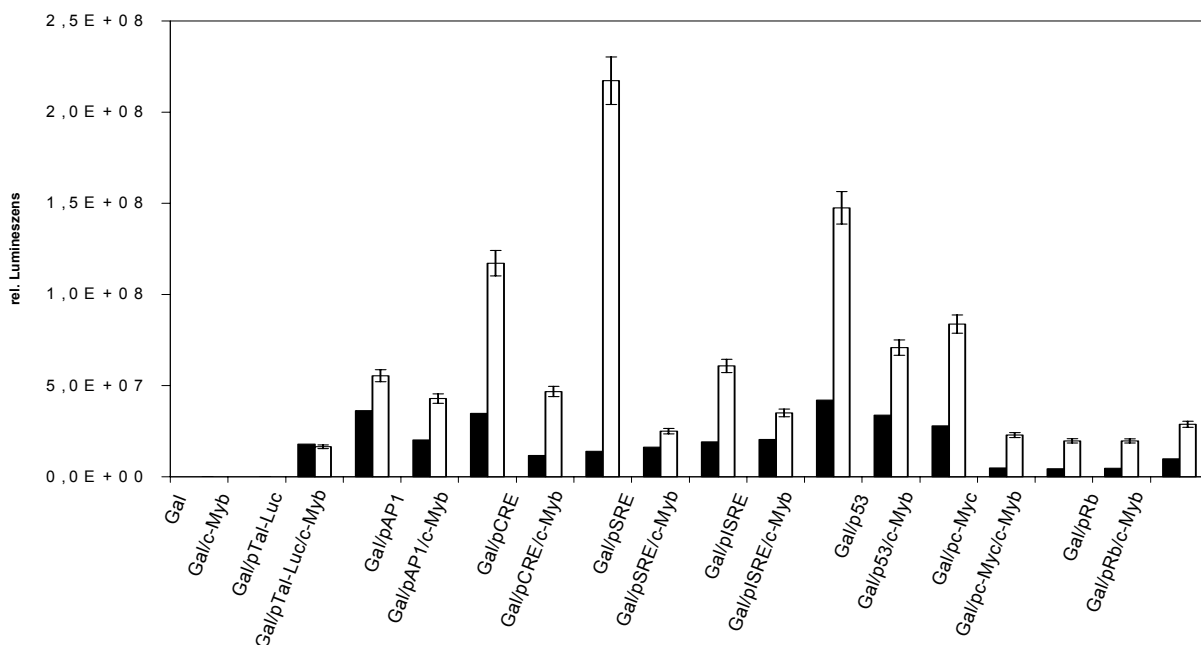


Abbildung 37: Daten des *Mercury-Pathway Profiling-Systems* für c-Myb. Die schwarzen Balken stellen die Messwerte, die weißen die auf β -Galaktosidase normierten Werte dar. c-Myb steht für pcDNAMyb, die anderen Plasmide enthalten eine representative Promotorsequenz des jeweiligen Proteins

Auffällig ist die starke Aktivierung der Promotoren AP-1, CRE, SRE und ISRE durch c-Myb. Leider wird dieses Ergebnis durch die Aktivierung des Kontroll-Plasmids pTal-Luc durch c-Myb relativiert. Wenn der Betrag der Aktivierung des Leervektors von den Daten abgezogen wird, ist lediglich für CRE und SRE eine leichte Aktivierung zu beobachten.

3.3.2 Test von verschiedenen Transkriptionsfaktoren auf c-Myb Interaktion

Eine andere Möglichkeit, neue Interaktionspartner für c-Myb zu finden, ist die direkte Kotransfektion im Reporterassay. Hierfür standen eine Reihe eukaryotischer Expressionsvektoren zur Verfügung. Die Faktoren wurden wie unter 2.3.3 beschrieben mit c-Myb und dem *mim-1* Promotor in TSA 3pG Zellen transfiziert nach drei Tagen Wachstum geerntet und ausgewertet. Die ermittelten Daten sind in Abbildung 38 zu sehen.

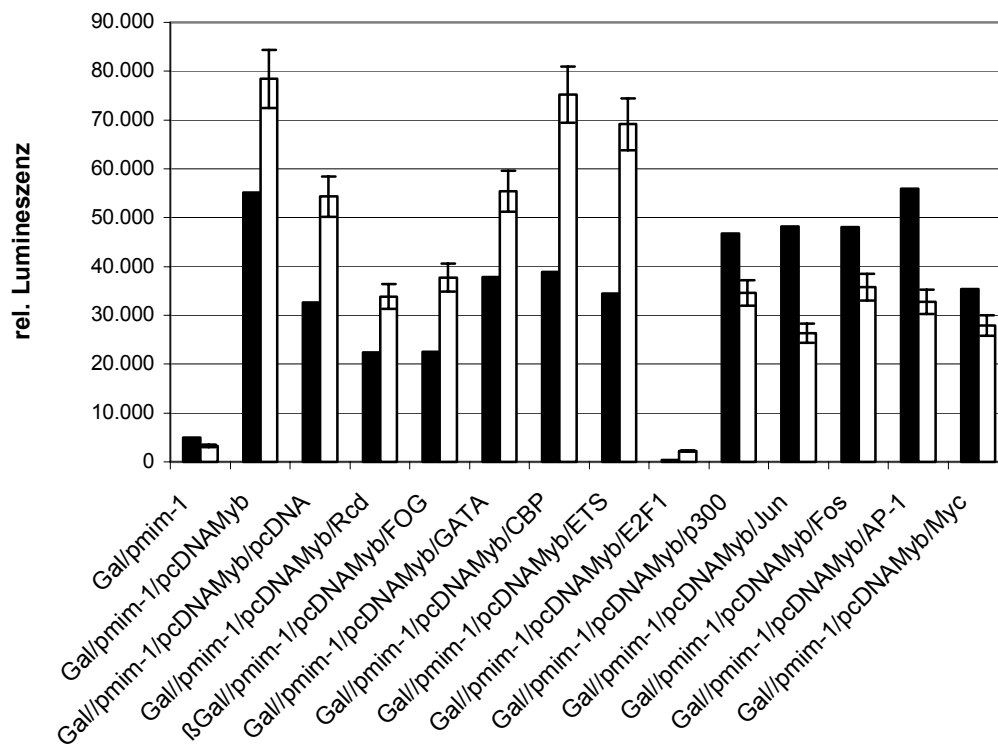


Abbildung 38: Ergebnisse des Reporterassays mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren am *mim-1* Promotor. Die schwarzen Balken stellen die Messwerte, die weißen die auf β -Galaktosidase normierten Werte dar

Die Ergebnisse aus dem Reporterassay zeigen wie erwartet für Rcd-1 (vgl. Abschnitt 3.1) und Fog (Ackermann, 2002) eine leichte Abnahme des Luziferase Signals. Bei den Faktoren CBP und ETS konnte keine Veränderung festgestellt werden. Die Faktoren GATA, p300, c-Jun, c-Fos, AP-1 und c-Myc zeigen dagegen eine leichte Abnahme des Signals. Der stärkste Effekt ließ sich jedoch bei dem Faktor E2F1 beobachten. Hier sank die Signalstärke so stark, dass sie teilweise noch unter den Kontrollwert mit pmim-1-Luc ohne c-Myb sank. E2F1 ist offenbar in der Lage die Aktivierung des *mim-1* Promotors nahezu vollständig zu unterbinden.

Um diese Inhibition genauer betrachten zu können, wurden Reporterassays mit c-Myb und E2F1 in unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 dargestellt.

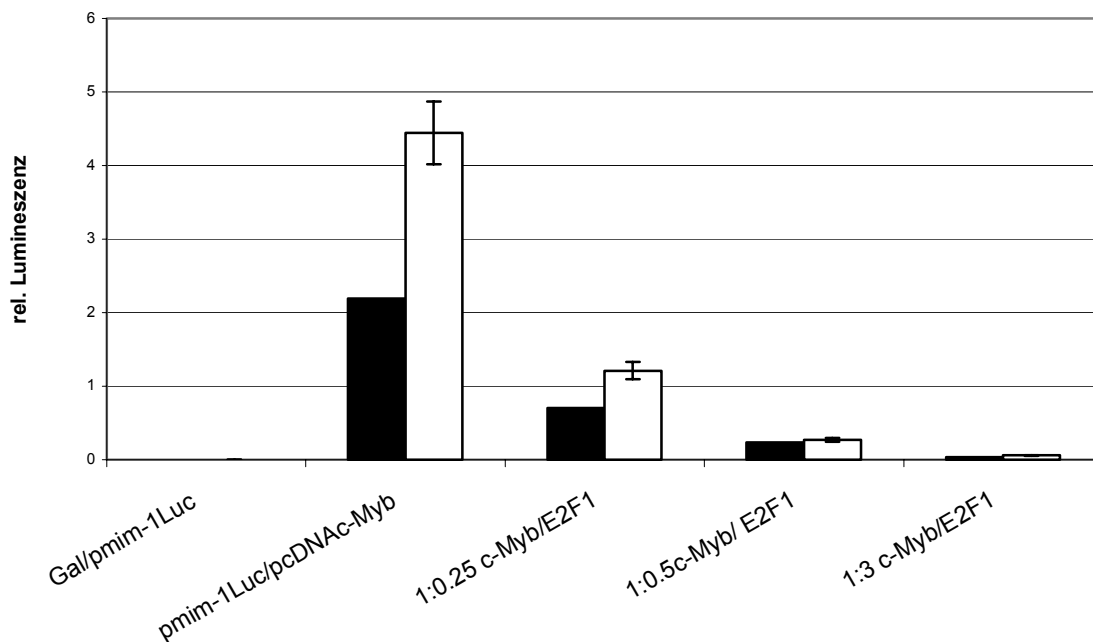


Abbildung 39: Daten aus dem Reporterassay in TSA 3pG Zellen mit c-Myb und E2F1 am *mim-1* Promotor. E2F1 wurde dazu in ansteigendem Verhältnis in die Ansätze pipettiert. Die schwarzen Balken stellen die Messwerte, die weißen die auf β -Galaktosidase normierten Werte dar

In Abbildung 39 ist deutlich der Einfluss von E2F1 auf die Aktivierung des *mim-1* Promotors durch c-Myb zu erkennen. Steigende Konzentrationen von E2F1 inhibieren die Aktivierung des Promotors stark, bis schließlich bei einem Verhältnis von 1:3 (c-Myb/E2F1) kaum noch Aktivierung zu beobachten ist.

3.3.3 Kopräzipitation mit E2F1 und c-Myb

Um die Frage zu klären, ob dieser starke Einfluss von E2F1 durch eine Konkurrenz am Promotor, oder auf eine direkte Wechselwirkung von c-Myb und E2F1 zurückzuführen ist, wurde eine Kopräzipitation der beiden Proteine durchgeführt.

Die Durchführung entspricht der unter 2.6.5 beschriebenen. Die Kopräzipitation wurde in TSA 3pG Zellen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 40 dargestellt.

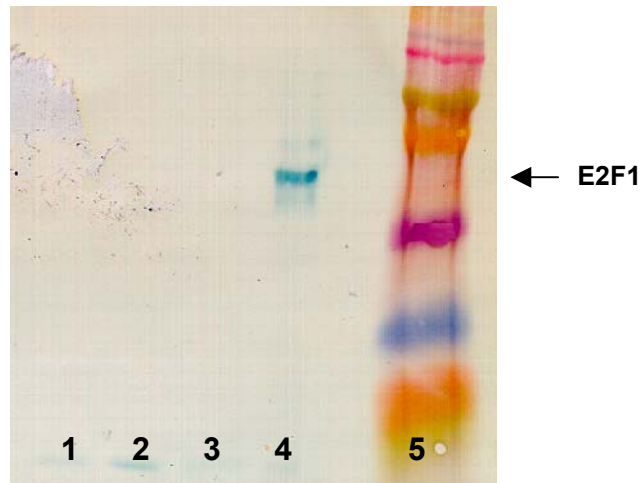


Abbildung 40: Kopräzipitation mit c-Myb und E2F1, gefärbt mit einem spezifischen E2F1-Antikörper (Sigma)

1:TSA 3pG Zellen; 2: CNBr-Sepharose mit c-Myb transfizierten Zellkernextrakten; 3: CNBr-Sepharose mit E2F1 transfizierten Zellkernextrakten ; 4: CNBr-Sepharose mit c-Myb und E2F1 transfizierten Zellkernextrakten; 5: Rainbow-Marker

Wie in Abbildung 41 zu erkennen ist, konnte E2F1 nur in den c-Myb/E2F1 kotransfizierten Zellen nachgewiesen werden. In den *lane* 1 bis 3 sind die unbehandelten beziehungsweise mit einem Vektor transfizierten Zellkernextrakte. Hier konnte kein E2F1 nachgewiesen werden.

Die beiden Proteine wechselwirken miteinander. Diese Wechselwirkung inhibiert vermutlich die Aktivierung durch c-Myb am *mim-1* Promotor.

4 Diskussion

Die Bedeutung von c-Myb für Prozesse der Zelldifferenzierung vor allem im hämatopoetischen System, ist seit vielen Jahren bekannt (Review Friedman, 2002). In ihm reifen pluripotente Stammzellen zu erythroiden, lymphoiden und myeloiden Zellen, die sich zu spezialisierten Blutzellen differenzieren. An diesen Differenzierungsprozessen sind eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren beteiligt, die zahlreiche Protein/Protein- und Protein/DNA-Interaktionen ermöglichen. Auch für c-Myb konnte gezeigt werden, dass es seine Aufgaben bei diesen Prozessen nicht allein, sondern im Zusammenspiel mit zahlreichen Kofaktoren erfüllt. Die genaue Rolle von c-Myb in dem komplexen Wechselspiel aus Transkriptions- und Kofaktoren konnte jedoch bis heute nicht aufgeklärt werden. Um die Funktion von c-Myb in diesen Signalkaskaden besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit bisher unbekannte Kofaktoren von c-Myb gefunden und ihr Zusammenwirken mit c-Myb untersucht.

4.1 Versuche mit dem c-Myb Kofaktor Rcd-1

Der Kofaktor Rcd-1 wurde von M. Siegert im *Two-Hybrid-Screen* als möglicher Wechselwirkungspartner von c-Myb entdeckt (Siegert, 1998). Im ersten Teil der Arbeit sollte die Wechselwirkung bestätigt und näher charakterisiert werden.

Die hierzu notwendige Expression und Aufreinigung als His₆-Fusionsprotein konnte erfolgreich ausgeführt werden. Nach der Aufreinigung und der Dialyse betrug die Reinheit des Proteins über 95%. Nachdem Rcd-1 als Fusionsprotein vorlag, konnte mittels *Pull-Down-Assay* eine Wechselwirkung zwischen Rcd-1 und dem c-Myb Fragment AS 500-600 nachgewiesen werden. Ein *Pull-Down-Assay* mit längeren c-Myb Proteinfragmenten, oder dem aufgereinigten *full-length* Protein konnte nicht durchgeführt werden, da es nicht möglich war, andere oder längere Fragmente des Proteins zu exprimieren und in ausreichender Qualität aufzureinigen. Daher wurde versucht, die Wechselwirkung mit *full-length* c-Myb durch eine Kopräzipitation *in vivo* nachzuweisen. In den hierfür eingesetzten HEK 293 Zellen ließ sich Wechselwirkung bestätigen. Diese Ergebnisse untermauern die aus dem *Two-Hybrid-System* stammenden Daten. Damit wurde bestätigt, dass Rcd-1 ein neuer Kofaktor für c-Myb ist.

Datenbankanalysen ergaben, dass Rcd-1 zu 70% homolog mit CAF40 (*CCR4 associated factor*) ist. CAF40 ist ein Bestandteil des CCR4-Not-Komplexes. Dieser hochkonservierte Komplex erfüllt in Hefe Funktionen als Transkriptionsmediator. Er wurde zuerst in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt. Dort wirkt er sowohl aktivierend, wie auch inhibierend auf die Transkription. Der CCR4-Not-Komplex kommt in der Zelle als 1,0 oder 1,9 MDa großer Komplex vor. Der 1,0 MDa Komplex besteht aus den Proteinen CCR4, CAF1, CAF40, CAF130 und Not1 bis 5. Einige der von CCR4 regulierten Gene sind verantwortlich für das Zellwachstum und die Zellzyklus-Regulation. CCR4 wurde als die katalytische Komponente der cytoplasmatischen Deadenylase identifiziert (Tucker *et al.*, 2001) (Chen *et al.*, 2002). Das Monomer zeigt dabei eine 3'-5' Exonuklease Aktivität für RNA und einzelsträngige DNA. Eine Abhängigkeit der katalytischen Aktivität von den anderen Proteinen des CCR4-Not-Komplexes besteht nicht. Durch Bindungsassays von Rcd-1 an doppelsträngige DNA-Zellulose, konnte nachgewiesen werden, dass Rcd-1 nicht an DNA bindet.

Zur Charakterisierung der Wechselwirkung beider Proteine, wurde zunächst die Lokalisation von Rcd-1 in der Zelle untersucht. Mit Hilfe von GFP-markiertem Rcd-1 konnte nachgewiesen werden, dass ein Grossteil des Proteins im Zellkern und nur ein kleiner Teil von Rcd-1 im Cytosol zu finden ist. Die Verteilung über Zellkern und Cytosol überrascht nicht, wenn man die Rolle von Rcd-1 in der Hefe betrachtet, wo es sowohl ein Teil des CCR4-Not-Komplexes im Cytosol als auch an Prozessen der Histonacetylierung im Kern beteiligt ist (Allen *et al.*, 2003). In der Säugetier-Zelle ist c-Myb vorwiegend im Zellkern lokalisiert (Klempnauer *et al.*, 1986). Im Cytosol könnte Rcd-1 daher unabhängig von c-Myb agieren. Die Vermutung, dass ein CCR4-analoger Komplex in Säugerzellen existiert, wird durch kürzlich entdeckte Homologe des Komplexes gestützt (Denis *et al.*, 2003). Rcd-1 und c-Myb wechselwirken offenbar nicht ausschließlich miteinander, sondern sind in ein Netzwerk von Transkriptionsfaktoren eingebunden.

Mittels RT-PCR konnte das Expressionsmuster von Rcd-1 ermittelt werden. Der Vergleich mit dem von c-Myb zeigt dabei eine nahezu gleiche Verteilung der Proteine in den verschiedenen Zelltypen. Die besonders ausgeprägte Expression im Knochenmark hängt vermutlich mit der Rolle von c-Myb bei der Blutbildung beziehungsweise -differenzierung zusammen. Aber auch in Milz und Leber, die für den Abbau von Blutzellen zuständig sind, liegt eine hohe Expressionsrate für die beiden Proteine vor.

Die hohe Expressionsrate in der Leber könnte auch mit der Rolle der Leber bei der fötalen Blutbildung zusammenhängen. Die Interpretation des hohen Expressionslevels in der Niere ist auf den ersten Blick schwieriger. Möglicherweise hängt er aber mit der Verknüpfung von Rcd-1 mit Erythropoetin zusammen, das hauptsächlich in der Niere gebildet wird. Dies wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

Die Daten der Expression von c-Myb in Leber und Milz belegen die bereits bekannte Bedeutung von c-Myb bei der Entwicklung von Zellen des hämatopoetischen Systems und lassen vermuten, dass Rcd-1 an diesen Prozessen entscheidend beteiligt ist. Bisher sind jedoch keine Rcd-1-Deletionsversuche in Säugetierzellen durchgeführt worden, die diese Theorie endgültig bestätigen könnten. Die für c-Myb nachgewiesene starke Expression in der Lunge hängt dagegen vermutlich mit der Rolle von c-Myb im vaskulären System und bei der Differenzierung von Endothelzellen zusammen (Hiroi *et al.*, 2002). Da Rcd-1 in der Lunge ebenfalls sehr stark exprimiert wird, lässt sich auch bei diesen Prozessen eine gemeinsame Funktion von c-Myb und Rcd-1 vermuten. Es wird interessant festzustellen, ob sich diese Gemeinsamkeit auf weitere Funktionen von c-Myb bezieht und Rcd-1 beziehungsweise den CCR4-Not-Komplex so zu einem universellen Kofaktor von c-Myb macht.

In vollständig differenzierten Organen wie Gehirn, Thymus oder der Muskulatur konnte dagegen wenig Expression der beiden Proteine nachgewiesen werden, was wiederum die Rolle der beiden Faktoren bei Differenzierungsprozessen unterstreicht. In vollständig ausdifferenzierten Zelltypen werden sie nicht mehr benötigt.

Die in den Reporterassays ermittelte dosisabhängige Inhibition des c-Myb-Signals am *mim-1* Promotor liefert erste Hinweise auf die Art des Zusammenwirkens von Rcd-1 und c-Myb. Rcd-1 dient *in vivo* offenbar als Repressor für c-Myb. Mittels semiquantitativer RT-PCR und *western-blot* Analysen wurde

belegt, dass Erythropoetin (EPO) die Expression von Rcd-1 Hel Zellen erhöht. In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Erythropoetin-Injektion in Mäuse zu einer Stimulation des Rcd-1-Signals führt (Gregory *et al.*, 1998). Diese Steigerung der Expression sollte auf einen Effekt am Promotor des *rcd-1* Gens zurückzuführen sein, wobei auch eine stabilisierende Wirkung auf die *rcd-1*-mRNA durch EPO bewirkt werden könnte. Um diese Fragen zu klären, wurden verschiedene Versuche zur Expression von Rcd-1 unter EPO Stimulation durchgeführt.

Die Wirkung von EPO auf HEL Zellen wurde mittels RT-PCR und *western-blot* untersucht und es konnte eine Zunahme von *rcd-1* nach EPO Stimulation gezeigt werden. Mittels FACS-Untersuchung (*fluorescent activated cell scanner*) wurde zuvor nachgewiesen, dass die Zellen einen Erythropoetin-Rezeptor auf der Oberfläche tragen, so dass das Signal ins Zellinnere weitergeleitet werden kann. Als Ergebnis der Versuche wurde nach EPO-Stimulation eine Zunahme der *rcd-1* mRNA auf ungefähr das Doppelte beobachtet. Diese Ergebnisse konnten mit Hilfe von *western-blot* Untersuchungen für das Rcd-1 Protein bestätigt werden (Haas, 2000).

Die Frage schließlich, ob die Zunahme von Rcd-1 auf eine direkte Wirkung am *rcd-1* Promotor zurückzuführen ist, konnte mittels Reporterassay Versuchen aufgeklärt werden. Dabei wurde eine Erhöhung der Expressionsrate des Reportergens Luziferin nach EPO Stimulation in HEL Zellen nachgewiesen. Die gewonnenen Daten zeigen eine Aktivität direkt am Rcd-1 Promotor an, die sich durch Zunahme der Expression von Luziferin nachweisen ließ.

Im *Mercury-Pathway*-System konnte durch Rcd-1 eine Aktivierung des AP-1 Promotors nachgewiesen werden. Auch für das *cAMP response element* (CRE) konnte eine Aktivierung durch Rcd-1 belegt werden. Diese Ergebnisse passen zu den vorher diskutierten Daten, die belegen, dass der erythroide Faktor Erythropoetin Einfluss auf Rcd-1 nimmt. An der durch EPO ausgelösten Signalkaskade sind sowohl CRE als auch AP-1 beteiligt. Die Aktivierung durch ISRE (*Interferon stimulated response element*) durch Rcd-1 zeigt, dass der Faktor auch an anderen Signalprozessen beteiligt ist, die über die bisher diskutierten Funktionen hinausgehen.

Die gemeinsame Rolle von c-Myb und Rcd-1 in der Zelle ist noch nicht ausreichend aufgeklärt. Es lässt sich zusammenfassen, dass Rcd-1 ein Kofaktor von c-Myb ist und in verschiedenen Organen gemeinsam mit c-Myb exprimiert wird. In diesen Organen ist Rcd-1 vermutlich unter anderem an Differenzierungs- und Wachstumsprozessen, von Endothelzellen beteiligt. Und auch in Prozessen bei der Entwicklung von hämatopoetischen Zellen sind die beiden Proteine gemeinsam beteiligt. Dies wird unter anderem durch den Effekt von EPO auf den Expressionsgrad von Rcd-1 deutlich. Hier wird auch der antagonistische Charakter von Rcd-1 und c-Myb bestätigt, den für c-Myb wurde eine Repression durch EPO beschrieben, wie sie in Abbildung 41 dargestellt ist. Für Rcd-1 und AP-1 konnte eine Zunahme der Expression durch EPO beobachtet werden (Haas, 2000; Bergelson *et al.* 1998). Ebenso konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass Rcd-1 einen inhibitorischen Einfluss auf die c-Myb-Aktivität im *mim-1* Promotor ausübt. Die Wechselwirkung zwischen Rcd-1 und CCR4 ist in Säuger-Zellen noch unklar.

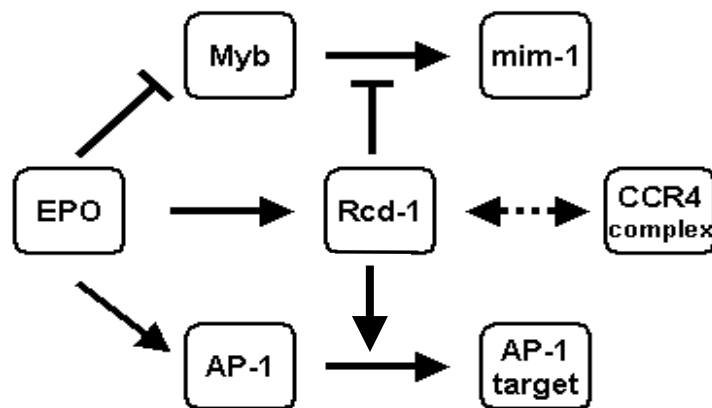


Abbildung 41: Möglicher Zusammenhang von c-Myb, Rcd-1 und EPO

In der Bäckerhefe liegt Rcd-1 in einem Multiprotein-Komplex vor (CCR4-Not-Komplex). In Säugetierzellen existiert ein ähnlicher Komplex, der dem CCR4-Komplex der Hefe ähnelt, einige der Komponenten dieses Komplexes konnten bereits identifiziert werden (Denis *et al.*, 2003). Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde in der vorliegenden Arbeit eine Kolokalisation von Rcd-1 mit CCR4 in TSA 3pG Zellen nachgewiesen.

In der Hefe wurde für den CCR4-Not-Komplex eine Ubiquitin-Ligase und eine Deadenylase-Aktivität beobachtet (Chen *et al.*, 2002). Der Komplex kann mit Komponenten der Transkriptionsmaschinerie wie TAFs (*transcription*

accessory factor) (Deluen *et al.*, 2002) und SRBs der Polymerase II (*suppressors of RNAPolymeraseB*) wechselwirken (Liu *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurde *in vivo* eine Repression der RNA-Polymerase II-Aktivität beschrieben. Dies alles weist Rcd-1 beziehungsweise dem CCR4-Not-Komplex eine Position als Transkriptionsregulationskomplex zu, der sich anderen regulatorischen Komplexen wie SAGA oder SWI/SNF unterscheidet. Für c-Myb wurden ebenfalls Interaktionen mit Proteinen, die an der Regulation der Transkription beteiligt sind, beschrieben. Als Beispiele seien hier die Histonacetyltransferase CBP oder der SWI/SNF *chromatin remodeling* Komplex genannt.

In *Schizosaccharomyces pombe* ist Rcd-1 an der Ste11-Signalkaskade beteiligt und steuert hier die durch Stickstoff-Mangel ausgelöste Konjugation der Hefen (Okazaki *et al.*, 1998). Auch in F9-Zellen ist Rcd-1 an der durch Retinsäure induzierten Differenzierung beteiligt (Hiroi *et al.*, 2002). Dabei geht Rcd-1 vermutlich einen Komplex mit ATF-2 (*activation transcription factor-2*) ein, was zu einer Transaktivierung von c-Jun führt (Kawasaki *et al.*, 1998).

Die c-Myb-Zielgene sind ebenfalls an der Regulation der Transkription beteiligt. So wurde für *mim-1* eine mögliche Histon-Acetyltransferaseaktivität beschrieben. Somit ist es möglich, dass die dosisabhängige Inhibition am *mim-1* Promotor zu einer verminderten Histon-Acetylierung und damit zu einer CCR4 bedingten Repression der RNA-Polymerase II führt.

Die Frage, ob es in Säuger-Zellen einen Hefe-analogen CCR4-Not-Komplex gibt, ist noch nicht endgültig geklärt. Aktuell wird mittels Two-Hybrid-System und Rcd-1 als Köder versucht, weitere Komponenten des Komplexes zu finden, außerdem konnten mittels *Pull-Down*-Experimenten mehrere Proteine aus Hek 293 Zellkernextrakten gefunden werden, die mit Rcd-1 wechselwirken. Diese Experimente sind jedoch noch nicht abgeschlossen, sodass die Frage nach der Zusammensetzung eines CCR4-Not-Komplexes in Säuger-Zellen hier nicht abschließend geklärt werden kann.

4.2 Mercury-Pathway-System mit c-Myb

Bei dem *Mercury-Pathway*-System mit c-Myb ließ sich für alle Faktoren mit Ausnahme von c-Myc eine Aktivierung um etwa das Doppelte beobachten. Das c-Myc Signal nimmt dagegen leicht ab. Bei der Interpretation der Daten muss darauf geachtet werden, dass auch für den Kontrollvektor eine Erhöhung des Signals zu beobachten ist. Zieht man den Betrag der Aktivierung des Kontrollvektors von den

Daten ab, bleibt lediglich eine leichte Aktivierung an den Promotoren für CRE (*cAMP response element*) und SRE (*serum response element*). Wie erwähnt ist CRE an der EPO-Signalkaskade beteiligt. Für EPO wurde eine inhibierende Wirkung auf c-Myb beschrieben, was nicht zu der Aktivierung von cAMP durch c-Myb passt. Es wäre möglich, dass c-Myb, sobald es gebildet wird, selbst Signale zu seiner eigenen Inaktivierung gibt (vergleiche Abbildung 42). So kann erreicht werden, dass die c-Myb Aktivität in den Zellen hochreguliert ist. Ein weiterer Mechanismus zur Regulation von c-Myb, der proteolytische Abbau des Proteins (Daten nicht dargestellt), könnte so unterstützt werden.

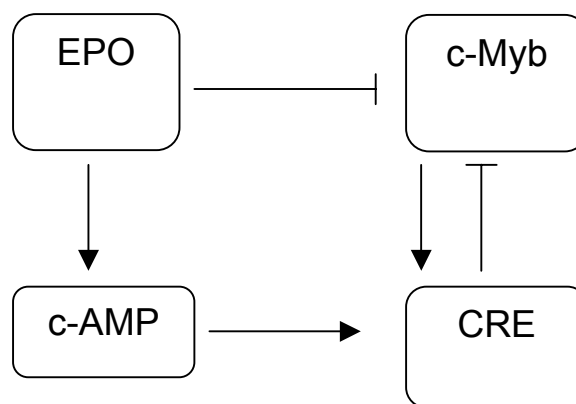


Abbildung 42: Interaktion von CRE und c-Myb

Für SRE wurde auch durch Rcd-1 eine Aktivierung gefunden. Offenbar spielen beide Proteine in diesem Signalweg eine Rolle, die allerdings bis jetzt nicht näher aufgeklärt werden konnte.

4.3 Interaktion von c-Myb mit E2F1

Im Reporterassay konnte die Inhibition der transaktivierenden Eigenschaften von c-Myb am *mim-1* Promotor durch E2F1 nachgewiesen werden. E2F1 ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Der Effekt von E2F1 auf c-Myb ist dosisabhängig. Nachdem der Effekt von E2F1 im Reporterassay nachgewiesen wurde, stellt sich die Frage, ob E2F1 direkt an die Promotorregion bindet und c-Myb verdrängt, oder ob eine Protein/Protein-Interaktion stattfindet, die eine Bindung von c-Myb an den *mim-1* Promotor verhindert. Diese Frage konnte mit einer Kopräzipitation von c-Myb und E2F1 geklärt werden. Beiden Proteine sind in der Lage, *in vivo* miteinander zu wechselwirken. E2F1 bindet demnach an c-Myb und erschwert eine Transaktivierung

durch c-Myb. Ferner gibt es in der *mim-1* Sequenz Bindungsstellen für E2F1. Vermutlich üben *in vivo* beide Effekte einen Einfluss auf die c-Myb-Aktivität aus.

E2F1 ist ein Mitglied der E2F-Familie. Diese sind an der Regulation des Zellzyklus beteiligt und lassen sich in zwei Klassen einteilen:

Zu den Aktivatoren gehören die Proteine E2F1, E2F2 und E2F3, zu den Repressoren zählen E2F4 und E2F5. E2F1 kann den Übergang von der G₁- in die S-Phase auslösen. Auch für c-Myb wird eine Beteiligung am Zellzyklus diskutiert (Ito, 2002). Beide Proteine könnten so den Übergang in die wichtige S-Phase steuern.

Interessanterweise konnte im *Mercury-Pathway*-System eine Aktivierung des *E2F-DNA binding element* durch Rcd-1 nachgewiesen werden, was wiederum Rcd-1 in die Kontrolle des Zellzyklus einbezieht. Die beschriebenen Daten sind in Abbildung 43 zusammengefasst.

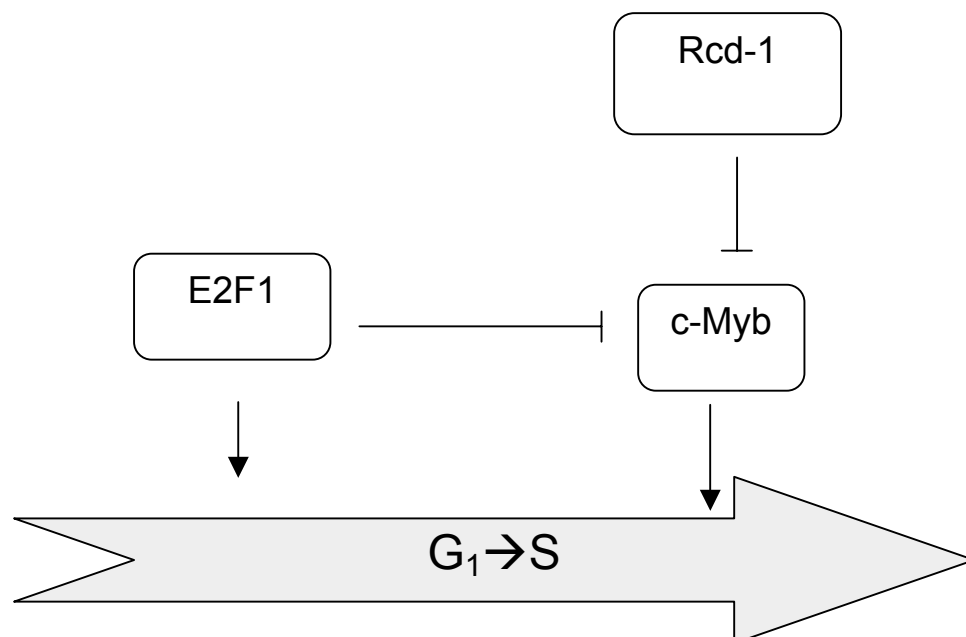


Abbildung 43: Interaktion von E2F1, c-Myb und Rcd-1 bei der Kontrolle des Zellzyklus

Dargestellt ist der mögliche Einfluss von Rcd-1 und E2F1 auf c-Myb, und dessen Auswirkung auf die Kontrolle des Zellzyklus. Vermutlich dient Rcd-1 als Inhibitor beim Übergang von der G₁- in die S-Phase. E2F1 wirkt ebenfalls inhibitorisch auf die c-Myb Aktivität. Ein Experiment, das die gleichzeitige Bindung von E2F1 und c-Myb am *mim-1* nachweisen kann, wäre ein elektrophoretisches *mobility shift assay* (EMSA) mit den drei Komponenten. Aus Zeitgründen ist dieser Versuch noch nicht aufgeführt worden.

4.4 Neue putative Kofaktoren von c-Myb

Die Identifizierung von neuen Kofaktoren mit dem *Two-Hybrid*-System lieferte fünf putative Kofaktoren. Für den Faktor *Sexcomb on midleg* ergab sich, ebenso wie bei c-Myb, eine hohe Expression in der Leber. In den anderen Organen konnten keine Übereinstimmungen beim Expressionsgrad gefunden werden. Im Reporterassay konnte am *mim-1* Promotor keine Wechselwirkung zwischen c-Myb und *Sexcomb on midleg* festgestellt werden. Diese Ergebnisse liefern keinen Hinweis dafür, dass es sich bei *Sexcomb on midleg* um einen Kofaktor von c-Myb handelt. Die detektierte Interaktion war entweder falsch positiv oder die Wechselwirkung beruht auf einer Veränderung der Aktivität von *Sexcomb on midleg* durch c-Myb, was mit dem durchgeführten Reporterassay nicht festgestellt werden kann.

Das Expressionsmuster von Dlxin-1 stimmt in den Organen Milz, Lunge, Knochenmark und Leber gut mit dem von c-Myb überein. In Mandeln und Thymus dagegen wurden hohe Expressionslevel für Dlxin-1 aber nicht für c-Myb gefunden. Die übereinstimmenden Expressionen in Milz, Knochenmark und der Leber könnte ein Indiz für eine gemeinsame Funktion bei der Differenzierung von Zellen des hämatopoetischen Systems sein, wie sie für c-Myb allein bereits bekannt ist. Der hohe Expressionslevel in der Lunge lässt auch auf eine gemeinsame Beteiligung an Prozessen der Zelldifferenzierung und des Zellwachstums von vaskulären Zellen schließen, wie sie für c-Myb beschrieben worden ist. Offenbar hat Dlxin-1 jedoch auch eine von c-Myb unabhängige Funktion, die im Thymus und in den Mandeln ausgeübt wird. Welche Aufgabe Dlxin-1 hier erfüllt, ist jedoch bisher nicht bekannt.

Das Reporterassay zeigte für Dlxin-1 eine Erhöhung der c-Myb Aktivität am *mim-1* Promotor. Möglicherweise dient Dlxin-1 in der Zelle als Aktivator von c-Myb. Dies ist ein weiterer Hinweis für die Wechselwirkung der beiden Proteine.

Für die identifizierte Tyrosinphosphatase konnte keine Beteiligung an einem der bekannten Signaltransduktionswege detektiert werden. Im *Phage-Display* ergab sich für den C-terminalen Bereich eine Wechselwirkung mit c-Myb AS 500-600, während für den N-terminalen und den mittleren Bereich der Tyrosinphosphatase kaum eine Wechselwirkung gezeigt werden konnte.

Die im *Phage-Display* gefundene Interaktion konnte im Reporterassay nicht bestätigt werden. Die Tyrosinphosphatase zeigte keinen messbaren Einfluss auf die Aktivität von c-Myb am *mim-1* Promotor. Es wäre nicht auszuschließen, dass andere

Zielsequenzen gleichzeitig von der Tyrosinphosphatase und c-Myb reguliert werden. Weil die Rolle der Tyrosinphosphatase im Zellzyklus noch ungeklärt ist, sind solche Sequenzen noch nicht verfügbar. Aus diesem Grunde wurde auf weitere Versuche verzichtet.

Der Tumorsuppressor 5qNCA zeigte im *Phage-Display* eine Wechselwirkung mit dem c-Myb Bereich AS 500-600 an. Die Versuche wurden mit einem Fragment von 5qNCA (Bp 325-975) durchgeführt, da sich das fast 200 kDa große Protein nicht in voller Länge exprimieren ließ. Die Wechselwirkung der beiden *full length* Proteine konnte mit einer Kopräzipitation bestätigt werden.

Das Expressionsmuster von 5qNCA deckt sich nur zum Teil mit dem von c-Myb. Leber, Lunge und Knochenmark weisen übereinstimmende Expression auf, während die hohe Expressionsrate in den Mandeln und die geringe Expression von 5qNCA in der Milz nicht übereinstimmen. Eine gemeinsame Beteiligung an der Differenzierung von Zellen des Knochenmarks und von Endothelzellen ist möglich, die fehlende Übereinstimmung in der Milz lässt dies jedoch fraglich erscheinen. Im Reporterassay konnte keine Veränderung der Aktivität gefunden werden, so dass bisher keine gemeinsame Funktion von c-Myb und 5qNCA bekannt ist. Hier könnten Experimente über die Lokalisation der beiden Proteine in Knochenmarkszellen, weiteren Aufschluss über eine gemeinsame Funktion *in vivo* liefern. Auch Reporterassays mit Zielsequenzen von 5qNCA könnten interessante Erkenntnisse über die Wechselwirkung von 5qNCA und c-Myb bringen. Aus Zeitgründen musste jedoch auf weitere Experimente verzichtet werden.

Die hier identifizierten Proteine offenbaren eine große Schwäche des verwendeten *Two-Hybrid*-Systems. Bei dem *screenen* der DNA-Bibliothek werden nicht alle Sequenzen repräsentiert, auf der anderen Seite werden scheinbar auch schwache Wechselwirkungen oder gar falsch positive Klone ausgewertet. Versuche mit neueren *Two-Hybrid*-Systemen, die nicht mehr in Hefen, sondern in Säugetier-Zellen arbeiten, bringen hier wahrscheinlich bessere Ergebnisse. Allerdings könnten Daten, die mit der DNA-Chip Technologie erhalten wurden, ein vollständigeres Bild des Signalnetzwerkes um und mit c-Myb liefern, da mit diesem System eine viel größere Zahl an Wechselwirkungspartnern ermittelt werden kann, als dies mit einem *Two-Hybrid*-System möglich ist.

5 Literaturverzeichnis

- Ackermann, K. (2002). Biochemische Charakterisierung der Transkriptionsfaktoren c-Myb und FOG-1. Dissertation, Universität Hannover.
- Allen, S. C. and T. R. Hebbes (2003). "Myb induced myeloid protein 1 (Mim-1) is an acetyltransferase." FEBS Lett **534**(1-3): 119-124.
- Antequera, F. and A. Bird (1999). "CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins." Curr Biol **9**(17): 661-667.
- Arany, Z., W. R. Sellers, D. M. Livingston and R. Eckner (1994). "E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators." Cell **77**(6): 799-800.
- Armstrong, J. A. and B. M. Emerson (1998). "Transcription of chromatin: these are complex times." Curr Opin Genet Dev **8**(2): 165-172.
- Aziz, N., M. R. Miglarese, R. C. Hendrickson, J. Shabanowitz, T. W. Sturgill, D. F. Hunt and T. P. Bender (1995). "Modulation of c-Myb-induced transcription activation by a phosphorylation site near the negative regulatory domain." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **92**(14): 6429-6433.
- Aziz, N., J. Wu, J. W. Dubendorff, J. S. Lipsick, T. W. Sturgill and T. P. Bender (1993). "c-Myb and v-Myb are differentially phosphorylated by p42mapk in vitro." Oncogene **8**: 2259-2265.
- Badiani, P., P. Corbella, D. Kioussis, J. Marvel and K. Weston (1994). "Dominant interfering alleles define a role for c-Myb in T-cell development." Genes and Development **8**: 770-782.
- Bading, H., J. Gerdes, R. Schwarting, H. Stein and K. Moelling (1988). "Nuclear and cytoplasmic distribution of cellular myb protein in human haematopoietic cells evidenced by monoclonal antibody." Oncogene **3**(3): 257-265.
- Bergelson, S., U. Klingmuller, U. Socolovsky, M. Hsiao, J. G. Lodish, H. F. (1998). "Tyrosine residues within the intracellular domain of the erythropoietin receptor mediate activation of AP-1 transcription factors." J Biol Chem **273**(4): 2396-2401.
- Biedenkapp, H., U. Borgmeyer, A. E. Sippel and K. H. Klempnauer (1988). "Viral myb oncogene encodes a sequence-specific DNA-binding activity." Nature **335**(6193): 835-837.
- Bies, J., J. Markus and L. Wolff (2002). "Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity." J Biol Chem **277**(11): 8999-9009.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-1523.
- Bloch, A., X. M. Liu and L. G. Wang (1995). "Regulation of c-myb expression in ML-1 human myeloblastic leukemia cells by c-ets-1 protein." Adv. Enzyme Regul. **35**: 35-41.
- Braas, D., D. Kattmann, J. Miethe and K. H. Klempnauer (2003). "Analysis of DNase I-hypersensitive sites in the chromatin of the chicken adenosine receptor 2B gene reveals multiple cell-type-specific cis-regulatory elements." Gene **303**: 157-164.
- Brent, R. and M. Ptashne (1985). "A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor." Cell **43**(3 Pt 2): 729-736.

- Broccoli, D., A. Smogorzewska, L. Chong and T. de Lange (1997). "Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2." Nat Genet **17**(2): 231-235.
- Brown, K. E., M. S. Kindy and G. E. Sonenshein (1992). "Expression of the c-myb proto-oncogene in bovine vascular smooth muscle cells." J. Biol. Chem. **267**(7): 4625-4630.
- Burk, O., S. Mink, M. Ringwald and K. H. Klempnauer (1993). "Synergistic activation of the chicken mim-1 gene by v-myb and C/EBP transcription factors." Embo J. **12**(5): 2027-2038.
- Busch, M. P., B. G. Devi, L. H. Soe, B. Perbal, M. A. Baluda and P. Roy-Burman (1983). "Characterization of the expression of cellular retrovirus genes and oncogenes in feline cells." Hematol Oncol **1**(1): 61-75.
- Calabretta, B. and N. C. Nicolaides (1992). "c-myb and growth control." Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. **2**(3): 225-235.
- Calabretta, B., D. Venturelli and A. M. Gewirtz (1993). "Functional significance of c-myb expression in normal and leukemic hematopoiesis." Cancer Invest **11**: 191-197.
- Chen, J., Y. C. Chiang and C. L. Denis (2002). "CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase." Embo J **21**(6): 1414-1426.
- Chen, R. H. and J. S. Lipsick (1993). "Differential transcriptional activation by v-Myb and c-Myb in animal cells and *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **13**: 4423-4431.
- Clontech (1998). "Handbuch."
- Dai, P., H. Akimaru, Y. Tanaka, D. X. Hou, T. Yasukawa, C. Kanei-Ishii, T. Takahashi and S. Ishii (1996). "CBP as a transcriptional coactivator of c-Myb." Genes Dev **10**(5): 528-540.
- Dash, A. B., F. C. Orrico and S. A. Ness (1996). "The EVES motif mediates both intermolecular and intramolecular regulation of c-Myb." Genes Dev **10**(15): 1858-1869.
- Deluen, C., N. James, L. Maillet, M. Molinete, G. Theiler, M. Lemaire, N. Paquet and M. A. Collart (2002). "The Ccr4-not complex and yTAF1 (yTaf(II)130p/yTaf(II)145p) show physical and functional interactions." Mol Cell Biol **22**(19): 6735-6749.
- Denis, C. L. and J. Chen (2003). "The CCR4-NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **73**: 221-250.
- Dini, P. W., J. T. Eltman and J. S. Lipsick (1995). "Mutations in the DNA-binding and transcriptional activation domains of v-Myb cooperate in transformation." J. Virol. **69**(4): 2515-2524.
- Dini, P. W. and J. S. Lipsick (1993). "Oncogenic truncation of the first repeat of c-Myb decreases DNA binding in vitro and in vivo." Mol Cell Biol **13**: 7334-7348.
- Dudek, H., R. Tantravahi, V. Rao, E. Reddy and P. Reddy (1992). "Myb and Ets proteins cooperate in transcriptional activation of the mim-1 promoter." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**: 1291-1295.
- Dulbecco, R. and G. Freeman (1959). Virology **8**: 396.
- Duprey, S. P. and D. Boettiger (1985). "Developmental regulation of c-myb in normal myeloid progenitor cells." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **82**(20): 6937-6941.
- Ebneth, A., O. Schweers, H. Thole, U. Fagin, C. Urbanke, G. Maass and H. Wolfes (1994). "Biophysical characterization of the c-Myb DNA-binding domain." Biochemistry **33**(48): 14586-14593.

- Egel, R., O. Nielsen and D. Weilguny (1990). "Sexual differentiation in fission yeast." Trends Genet **6**(11): 369-373.
- Eva, A., K. C. Robbins, P. R. Andersen, A. Srinivasan, S. R. Tronick, E. P. Reddy, N. W. Ellmore, A. T. Galen, J. A. Lautenberger, T. S. Papas, E. H. Westin, F. Wong-Staal, R. C. Gallo and S. A. Aaronson (1982). "Cellular genes analogous to retroviral onc genes are transcribed in human tumour cells." Nature **295**(5845): 116-119.
- Evers, R., A. Smid, U. Rudloff, F. Lottspeich and I. Grummt (1995). "Different domains of the murine RNA polymerase I-specific termination factor mTTF-I serve distinct functions in transcription termination." Embo J. **14**(6): 1248-1256.
- Fields, S. and O. Song (1989). "A novel genetic system to detect protein-protein interactions." Nature **340**(6230): 245-246.
- Frampton, J., A. Leutz, T. Gibson and T. Graf (1989). "DNA-binding domain ancestry." Nature **342**(6246): 134.
- Frampton, J., T. Ramqvist and T. Graf (1996). "v-Myb of E26 leukemia virus up-regulates bcl-2 and suppresses apoptosis in myeloid cells." Genes Dev **10**(21): 2720-2731.
- Friedman, A. D. (2002). "Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development." Oncogene **21**(21): 3377-3390.
- Fu, S. L. and J. S. Lipsick (1996). "FAETL motif required for leukemic transformation by v-Myb." J. Virol. **70**(8): 5600-5610.
- Gerondakis, S. and J. M. Bishop (1986). "Structure of the protein encoded by the chicken proto-oncogene c-myb." Mol Cell Biol **6**(11): 3677-3684.
- Gluzman, Y. (1981). "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants." Cell **23**(1): 175-182.
- Gonda, T. J., N. M. Gough, A. R. Dunn and J. de Blaquiére (1985). "Nucleotide sequence of cDNA clones of the murine myb proto-oncogene." Embo J. **4**(8): 2003-2008.
- Graf, T. (1992). "Myb: a transcriptional activator linking proliferation and differentiation in hematopoietic cells." Curr. Opin. Genet. Dev. **2**(2): 249-255.
- Graf, T. (1998). "Leukemogenesis: small differences in Myb have large effects." Curr Biol **8**(10): R353-355.
- Gregory, R. C., N. Jiang, K. Todokoro, J. Crouse, R. E. Pacifici and D. M. Wojchowski (1998). "Erythropoietin receptor and STAT5-specific pathways promote SKT6 cell hemoglobinization." Blood **92**(4): 1104-1118.
- Haas, M. (2000). Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des rcd1+-Promotors. Diplomarbeit, Unviversität Hannover.
- Hall, W. J., C. W. Bean and M. Pollard (1941). "A viral disease in chicken." Am. J. Vet. Res. **2**: 272-279.
- Hedge, S. P., A. Kumar, C. Kurschner and L. H. Shapiro (1998). "c-Maf interacts with c-Myb to regulate transcription of an early myeloid gene during differentiation." Mol Cell Biol **18**(5): 2729-2737.
- Hernandez-Munain, C. and M. S. Krangel (1994). "Regulation of the T-cell receptor delta enhancer by functional cooperation between c-Myb and core-binding factors." Mol Cell Biol **14**(1): 473-483.
- Hiroi, N., T. Ito, H. Yamamoto, T. Ochiya, S. Jinno and H. Okayama (2002). "Mammalian Rcd1 is a novel transcriptional cofactor that mediates retinoic acid-induced cell differentiation." Embo J **21**(19): 5235-5244.

- Hu, Y. L., R. G. Ramsay, C. Kanei-Ishii, S. Ishii and T. J. Gonda (1991). "Transformation by carboxyl-deleted Myb reflects increased transactivating capacity and disruption of a negative regulatory domain." Oncogene **6**(9): 1549-1553.
- Hu, Z., I. Gomes, S. K. Horrigan, J. Kravarusic, B. Mar, Z. Arbieva, B. Chyna, N. Fulton, S. Edassery, A. Raza and C. A. Westbrook (2001). "A novel nuclear protein, 5qNCA (LOC51780) is a candidate for the myeloid leukemia tumor suppressor gene on chromosome 5 band q31." Oncogene **20**(47): 6946-6954.
- Ibelgaufts, H. (1990). "How can oncogenic transcription factors cause cancer: a critical review of the myb story." Gentechnologie von A bis Z, VCH Verlagsgesellschaft **13**: 1301-1306.
- Ito, M. (2002). "[Regulation of plant cell cycle by Myb-like transcription factors]." Tanpakushitsu Kakusan Koso **47**(12 Suppl): 1633-1638.
- Ivanov, X., Z. Mladenov, S. Nedyalkov and T. G. Todorov (1962). Bull. Inst. Pathol. Comp. Amonaux **9**: 5-36.
- Ju, Q., B. Morrow and J. Warner (1990). "REB1, a Yeast DNA- Binding Protein with Many Targets, Is Essential for Cell Growth and Bears Some Resemblance to the Oncogene myb." Molec Cell Biol **10**: 5226-5234.
- Kadonaga, J. T. (1998). "Eukaryotic transcription: an interlaced network of transcription factors and chromatin-modifying machines." Cell **92**(3): 307-313.
- Kanei-Ishii, C., E. M. MacMillan, T. Nomura, A. Sarai, R. G. Ramsay, S. Aimoto, S. Ishii and T. J. Gonda (1992). "Transactivation and transformation by Myb are negatively regulated by a leucine-zipper structure." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**(7): 3088-3092.
- Katz, S., E. Kowenz-Leutz, C. Muller, K. Meese, S. A. Ness and A. Leutz (1993). "The NF-M transcription factor is related to C/EBP beta and plays a role in signal transduction, differentiation and leukemogenesis of avian myelomonocytic cells." Embo J **12**(4): 1321-1332.
- Katzen, A. L., J. Jackson, B. P. Harmon, S. M. Fung, G. Ramsay and J. M. Bishop (1998). "Drosophila myb is required for the G2/M transition and maintenance of diploidy." Genes Dev **12**(6): 831-843.
- Kawasaki, H., J. Song, R. Eckner, H. Ugai, R. Chiu, K. Taira, Y. Shi, N. Jones and K. K. Yokoyama (1998). "p300 and ATF-2 are components of the DRF complex, which regulates retinoic acid- and E1A-mediated transcription of the c-jun gene in F9 cells." Genes Dev **12**(2): 233-245.
- Kenney, S. C., E. Holley-Guthrie, E. B. Quinlivan, D. Gutsch, Q. Zhang, T. Bender, J. F. Giot and A. Sergeant (1992). "The cellular oncogene c-myb can interact synergistically with the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator in lymphoid cells." Mol Cell Biol **12**(1): 136-146.
- Kersten, C. (1999). Etablierung eines Yeast Two-Hybrid-Systems zur Detektion von Wechselwirkungen des Proto-Onkogenproduktes c-Myb, Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Kiewitz, A. a. W., H. (1997). "Mapping of Protein-Protein interactions between c-myb and its coactivator CBP by a new phage display technique." FEBS Letters **415**(3): 258-262.
- Klempnauer, K. H., H. Arnold and H. Biedenkapp (1989). "Activation of transcription by v-myb: evidence for two different mechanisms." Genes Dev **3**(10): 1582-1589.
- Klempnauer, K. H. and J. M. Bishop (1984). "Neoplastic transformation by E26 leukemia virus is mediated by a single protein containing domains of gag and myb genes." J. Virol. **50**(1): 280-283.

- Klempnauer, K. H. and A. E. Sippel (1986). "Subnuclear localization of proteins encoded by the oncogene v-myb and its cellular homolog c-myb." Mol Cell Biol **6**(1): 62-69.
- Kowenz-Leutz, E., P. Herr, K. Niss and A. Leutz (1997). "The homeobox gene GBX2, a target of the myb oncogene, mediates autocrine growth and monocytic differentiation." Cell **91**(2): 185-195.
- Kulesa, H., J. Frampton and T. Graf (1995). "GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblasts." Genes Dev **9**(10): 1250-1562.
- Laemmli (1970). "Cleavage of structural protein during assembly of the head of the bacteriophage T4." Nature **227**: 680-682.
- Lam, E. W., C. Robinson and R. J. Watson (1992). "Characterization and cell cycle-regulated expression of mouse B-myb." Oncogene **7**(9): 1885-1890.
- Lane, T., C. Ibanez, A. Garcia, T. Graf and J. Lipsick (1990). "Transformation by v-myb correlates with trans- activation of gene expression." Molec Cell Biol **10**: 2591-2598.
- Leech, M. J., W. Kammerer, D. J. Cove, C. Martin and T. L. Wang (1993). "Expression of myb-related genes in the moss, *Physcomitrella patens*." Plant J **3**(1): 51-61.
- Lemon, B. and R. Tjian (2000). "Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control." Genes Dev **14**(20): 2551-2569.
- Levenson, J. D., P. J. Koskinen, F. C. Orrico, E. M. Rainio, K. J. Jalkanen, A. B. Dash, R. N. Eisenman and S. A. Ness (1998). "Pim-1 kinase and p100 cooperate to enhance c-Myb activity." Mol Cell **2**(4): 417-425.
- Lin, H. H., D. C. Sternfeld, S. G. Shinpock, R. A. Popp and M. L. Mucenski (1996). "Functional analysis of the c-myb proto-oncogene." Curr. Top. Microbiol. Immunol. **211**: 79-87.
- Ling, M., F. Merante and B. H. Robinson (1995). "A rapid and reliable DNA preparation method for screening a large number of yeast clones by polymerase chain reaction." Nucleic Acids Res **23**(23): 4924-4925.
- Lipsick, J. S. (1996). "One billion years of Myb." Oncogene **13**(2): 223-235.
- Lipsick, J. S., J. Manak, N. Mitiku, C. K. Chen, P. Fogarty and E. Guthrie (2001). "Functional evolution of the Myb oncogene family." Blood Cells Mol Dis **27**(2): 456-458.
- Liu, H. Y., Y. C. Chiang, J. Pan, J. Chen, C. Salvatore, D. C. Audino, V. Badarinarayana, V. Palaniswamy, B. Anderson and C. L. Denis (2001). "Characterization of CAF4 and CAF16 reveals a functional connection between the CCR4-NOT complex and a subset of SRB proteins of the RNA polymerase II holoenzyme." J Biol Chem **276**(10): 7541-7548.
- Luchetti, M. M., P. Paroncini, P. Majlingova, J. Frampton, M. Mucenski, S. S. Baroni, P. Sambo, J. Golay, M. Introna and A. Gabrielli (2003). "Characterization of the c-Myb-responsive region and regulation of the human type I collagen alpha 2 chain gene by c-Myb." J Biol Chem **278**(3): 1533-1541.
- Lüscher, B., E. Christenson, D. W. Litchfield, E. G. Krebs and R. N. Eisenman (1990). "Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation." Nature **344**(6266): 517-522.
- Lüscher, B. and R. N. Eisenman (1992). "Mitosis-specific phosphorylation of the nuclear oncoproteins Myc and Myb." J Cell Biol **118**(4): 775-84.
- Majello, B., L. C. Kenyon and R. Dalla-Favera (1986). "Human c-myb protooncogene: nucleotide sequence of cDNA and organization of the genomic locus." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **83**(24): 9636-9640.

- Makowski, L. (1993). "Structural constraints on the display of foreign peptides on filamentous bacteriophages." Gene **128**(1): 5-11.
- Mann, M. R. and M. S. Bartolomei (2000). "Maintaining imprinting." Nat Genet **25**(1): 4-5.
- Marocco, A., M. Wissenbach, D. Becker, J. Paz-Ares, H. Saedler, F. Salamini and W. Rohde (1989). "Multiple genes are transcribed in *Hordeum vulgare* and *Zea mays* that carry the DNA binding domain of the myb oncoproteins." Mol Gen Genet **216**: 183-187.
- Martin, D. (1982). "HEL cells: a new human erythroleukemia cell line with spontaneous and induced globin expression." Science **216**: 1233-1235.
- Masuda, Y., A. Sasaki, H. Shibuya, N. Ueno, K. Ikeda and K. Watanabe (2001). "Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function." J Biol Chem **276**(7): 5331-5338.
- Masui, N., T. Nishikawa, Y. Takagi, M. Mori, T. Suzuki and K. Sato (2003). "The rat lysosomal trafficking regulator (Lyst) gene is mapped on the telomeric region of chromosome 17." Exp Anim **52**(1): 89-91.
- Matz, M. V. and e. al. (1999). Nature Biotech **17**: 969-973.
- Mettus, R. V., J. Litvin, A. Wali, A. Toscani, K. Latham, K. Hatton and E. P. Reddy (1994). "Murine A-myb: evidence for differential splicing and tissue-specific expression." Oncogene **9**(10): 3077-3086.
- Miura, O., Y. Miura, N. Nakamura, F. W. Quelle, B. A. Witthuhn, J. N. Ihle and N. Aoki (1994). "Induction of tyrosine phosphorylation of Vav and expression of Pim-1 correlates with Jak2-mediated growth signaling from the erythropoietin receptor." Blood **84**(12): 4135-4141.
- Miyama, K., G. Yamada, T. S. Yamamoto, C. Takagi, K. Miyado, M. Sakai, N. Ueno and H. Shibuya (1999). "A BMP-inducible gene, *dlx5*, regulates osteoblast differentiation and mesoderm induction." Dev Biol **208**(1): 123-133.
- Mucenski, M. L., K. McLain, A. B. Kier, S. H. Swerdlow, C. M. Schreiner, T. A. Miller, D. W. Pietryga, W. J. Scott, Jr. and S. S. Potter (1991). "A functional c-myb gene is required for normal murine fetal hepatic hematopoiesis." Cell **65**(4): 677-689.
- Ness, S., A. Marknell and T. Graf (1989). "The v- myb oncogene product binds to and activates the promyelocyte- specific *mim- 1* gene." Cell **59**: 1115-1125.
- Ness, S. A. (1996). "The Myb oncoprotein: regulating a regulator." Biochim Biophys Acta **1288**(3): 123-139.
- Ness, S. A. (1999). "Myb binding proteins: regulators and cohorts in transformation." Oncogene **18**(19): 3039-3046.
- Ness, S. A. and J. D. Engel (1994). "Vintage reds and whites: combinatorial transcription factor utilization in hematopoietic differentiation." Curr Opin Genet Dev **4**(5): 718-724.
- Nomura, N., M. Takahashi, M. Matsui, S. Ishii, T. Date, S. Sasamoto and R. Ishizaki (1988). "Isolation of human cDNA clones of myb- related genes A- myb and B-myb." Nucl Acids Res **16**: 11075-11081.
- Oelgeschläger, M., I. Nuchaprayoon, B. Lüscher and A. D. Friedman (1996). "C/EBP, c-Myb, and PU.1 cooperate to regulate the neutrophil elastase promoter." Mol Cell Biol **16**: 4717-4725.
- Ogata, K., H. Hojo, S. Aimoto, T. Nakai, H. Nakamura, A. Sarai, S. Ishii and Y. Nishimura (1992). "Solution structure of a DNA-binding unit of Myb: a helix-turn-helix- related motif with conserved tryptophans forming a hydrophobic core." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **89**(14): 6428-6432.

- Ogata, K., H. Kanai, T. Inoue, A. Sekikawa, M. Sasaki, A. Nagadoi, A. Sarai, S. Ishii and Y. Nishimura (1993). "Solution structures of Myb DNA-binding domain and its complex with DNA." Nucleic Acids Symp Ser(29): 201-202.
- Ogata, K., S. Morikawa, H. Nakamura, A. Sekikawa, T. Inoue, H. Kanai, A. Sarai, S. Ishii and Y. Nishimura (1994). "Solution structure of a specific DNA complex of the Myb DNA-binding domain with cooperative recognition helices." Cell **79**: 639-648.
- Ogryzko, V. V., R. L. Schiltz, V. Russanova, B. H. Howard and Y. Nakatani (1996). "The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases." Cell **87**(5): 953-959.
- Ohi, R., A. Feoktistova, S. McCann, V. Valentine, A. T. Look, J. S. Lipsick and K. L. Gould (1998). "Myb-related *Schizosaccharomyces pombe* cdc5p is structurally and functionally conserved in eukaryotes." Mol Cell Biol **18**(7): 4097-4108.
- Okada, M., H. Akimaru, D. X. Hou, T. Takahashi and S. Ishii (2002). "Myb controls G(2)/M progression by inducing cyclin B expression in the *Drosophila* eye imaginal disc." Embo J **21**(4): 675-684.
- Okano, M., S. Xie and E. Li (1998). "Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases." Nat Genet **19**(3): 219-220.
- Okazaki, N., K. Okazaki, Y. Watanabe, M. Kato-Hayashi, M. Yamamoto and H. Okayama (1998). "Novel factor highly conserved among eukaryotes controls sexual development in fission yeast." Mol Cell Biol **18**(2): 887-895.
- Paramio, J. M., M. L. Casanova, C. Segrelles, S. Mitnacht, E. B. Lane and J. L. Jorcano (1999). "Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16." Mol Cell Biol **19**(4): 3086-3094.
- Pfützner, E., J. Kirfel, P. Becker, A. Rolke and R. Schule (1998). "Physical interaction between retinoic acid receptor and the oncoprotein myb inhibits retinoic acid-dependent transactivation." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A **95**(10): 5539-5544.
- Pines, J. and T. Hunter (1990). "p34cdc2: the S and M kinase?" New Biol **2**(5): 389-401.
- Psyrembel (1998). Klinisches Wörterbuch, de Gruyter.
- Ramsay, R. G., A. L. Barton and T. J. Gonda (2003). "Targeting c-Myb expression in human disease." Expert Opin Ther Targets **7**(2): 235-248.
- Ramsay, R. G., S. Ishii and T. J. Gonda (1991). "Increase in specific DNA binding by carboxyl truncation suggests a mechanism for activation of Myb." Oncogene **6**(10): 1875-1879.
- Ramsay, R. G., N. Morrice, P. Van Eeden, V. Kanagasundaram, T. Nomura, J. De Blaquiére, S. Ishii and R. Wettenhall (1995). "Regulation of c-Myb through protein phosphorylation and leucine zipper interactions." Oncogene **11**(10): 2113-2120.
- Reik, W., A. Collick, M. L. Norris, S. C. Barton and M. A. Surani (1987). "Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice." Nature **328**(6127): 248-251.
- Rogers, S. W. and M. C. Rechsteiner (1986). "Microinjection studies on selective protein degradation: relationships between stability, structure, and location." Biomed Biochim Acta **45**(11-12): 1611-1618.
- Roitt, R., J. Brostoff and M. David (1985). Immunology, Gower, London New York.
- Rosson, D. and E. P. Reddy (1986). "Structure and mechanism of activation of the myb oncogene." Gene Amplif Anal **4**: 99-108.
- Roussel, M., S. Saule, C. Lagrou, C. Rommens, H. Beug, T. Graf and D. Stehelin (1979). "Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation." Nature **281**(5731): 452-455.

- Rushton, J. J., L. M. Davis, W. Lei, X. Mo, A. Leutz and S. A. Ness (2003). "Distinct changes in gene expression induced by A-Myb, B-Myb and c-Myb proteins." Oncogene **22**(2): 308-313.
- Rushton, J. J. and S. A. Ness (2001). "The conserved DNA binding domain mediates similar regulatory interactions for A-Myb, B-Myb, and c-Myb transcription factors." Blood Cells Mol Dis **27**(2): 459-463.
- Saikumar, P., J. L. Gabriel and E. P. Reddy (1994). "The Myb oncogene product induces DNA-bending." Oncogene **9**: 1279-1287.
- Saitoh, H., R. T. Pu and M. Dasso (1997). "SUMO-1: wrestling with a new ubiquitin-related modifier." Trends Biochem Sci **22**(10): 374-376.
- Sakura, H., C. Kanei-Ishii, T. Nagase, H. Nakagoshi, T. J. Gonda and S. Ishii (1989). "Delineation of three functional domains of the transcriptional activator encoded by the c-myb protooncogene." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **86**(15): 5758-5762.
- Schürmann, A. (2000). Strukturelle und funktionelle Untersuchungen am Transkriptionsfaktor c-Myb und seinem Kofaktor Rcd1+. Dissertation, Universität Hannover. Hannover.
- Shan, B., J. C. Medina, E. Santha, W. P. Frankmoelle, T. C. Chou, R. M. Learned, M. R. Narbut, D. Stott, P. Wu, J. C. Jaen, T. Rosen, P. B. Timmermans and H. Beckmann (1999). "Selective, covalent modification of beta-tubulin residue Cys-239 by T138067, an antitumor agent with in vivo efficacy against multidrug-resistant tumors." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**(10): 5686-5691.
- Siegert, M. (1998). Untersuchung von Protein-/Protein-Wechselwirkungen des Protoonkogens c-Myb. Hannover, Diplomarbeit, Universität hannover.
- Sleeman, J. P. (1993). "Xenopus A-myb is expressed during early spermatogenesis." Oncogene **8**(7): 1931-1941.
- Smith, G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." Science **228**(4705): 1315-1317.
- Stehelin, D., H. E. Varmus, J. M. Bishop and P. K. Vogt (1976). "DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA." Nature **260**(5547): 170-173.
- Sugano, S., C. Andronis, R. M. Green, Z. Y. Wang and E. M. Tobin (1998). "Protein kinase CK2 interacts with and phosphorylates the Arabidopsis circadian clock-associated 1 protein." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **95**(18): 11020-11025.
- Sundstroem and e. al. (1976). Int. J. Cancer **17**: 565-577.
- Tanikawa, J., T. Yasukawa, M. Enari, K. Ogata, Y. Nishimura, S. Ishii and A. Sarai (1993). "Recognition of specific DNA sequences by the c-myb protooncogene product: Role of three repeat units in the DNA-binding domain." Pnas **90**: 9320-9324.
- Tavner, F. J., R. Simpson, S. Tashiro, D. Favier, N. A. Jenkins, D. J. Gilbert, N. G. Copeland, E. M. Macmillan, J. Lutwyche, R. A. Keough, S. Ishii and T. J. Gonda (1998). "Molecular cloning reveals that the p160 Myb-binding protein is a novel, predominantly nucleolar protein which may play a role in transactivation by Myb." Mol Cell Biol **18**(2): 989-1002.
- Thiele, C. J., P. S. Cohen and M. A. Israel (1988). "Regulation of c-myb expression in human neuroblastoma cells during retinoic acid-induced differentiation." Mol Cell Biol **8**(4): 1677-1683.
- Tice-Baldwin, K., G. R. Fink and K. T. Arndt (1989). "BAS1 has a Myb motif and activates HIS4 transcription only in combination with BAS2." Science **246**(4932): 931-935.

- Tucker, M., M. A. Valencia-Sanchez, R. R. Staples, J. Chen, C. L. Denis and R. Parker (2001). "The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*." Cell **104**(3): 377-386.
- Vassilev, L. and E. M. Johnson (1990). "An initiation zone of chromosomal DNA replication located upstream of the c-myc gene in proliferating HeLa cells." Mol Cell Biol **10**(9): 4899-4904.
- Verger, A., J. Perdomo and M. Crossley (2003). "Modification with SUMO." EMBO Rep **4**(2): 137-42.
- Westin, E., R. Gallo, R.C. Arya, A. Eva, L. Souza, M. Baluda, S. Aaronson and F. Wong- Staal (1982). "Differential expression of the amv gene in human hematopoietic cells." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **79**: 2194-2198.
- Weston, K. and J. M. Bishop (1989). "Transcriptional activation by the v-myb oncogene and its cellular progenitor, c-myb." Cell **58**(1): 85-93.
- Weston, K. M. (1990). "The myb genes." Semin Cancer Biol **1**(6): 371-382.
- Wolfes, H., et al. (2001). "Characterization of direct readout contacts of the Myb DNA-binding domain." Blood Cells Mol Dis **27**(2): 464-9.
- Wolff, L. (1996). "Myb-induced transformation." Crit Rev Oncog **7**(3-4): 245-260.
- Yamamoto, M. (1996). "Regulation of meiosis in fission yeast." Cell Struct Funct **21**(5): 431-436.

