

Der pathomolekulare Mechanismus einer t(4;11)-assoziierten Leukämie

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Adelheid Bursen
aus Mediasch/Rumänien

Frankfurt am Main, 2004
(DF1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Marschalek

2. Gutachter: Prof. Dr. Th. Dingermann

3. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Bohlander

Datum der Disputation: 14.12.2004

***Für
Johann, Katharina und Reinhold
– meine Eltern***

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Chromosomale Translokationen	3
2.2 Die Translokation t(4;11)(q21;q23)	5
2.2.1 Klinische Eigenschaften t(4;11)-assoziierter Leukämien	5
2.2.2 Molekulare Untersuchungen der Translokation t(4;11) - Die beteiligten Gene.....	8
2.2.3 Entstehung einer Translokation t(4;11) - Hypothesen	12
2.3 Die Wildtyp-Proteine MLL und AF4.....	17
2.3.1 Funktionelle Domänen des <i>MLL</i> Genprodukts	17
2.3.2 MLL als Kontrollprotein der Differenzierung	20
2.3.3 Funktionelle Domänen des <i>AF4</i> Genprodukts	22
2.4 Pathomolekulare Mechanismen der Leukämieentstehung nach einem 11q23 Rearrangement	26
2.4.1 Bedeutung der MLL Fusionsproteine für die Transformation	26
2.4.2 Die t(4;11)-assozierten Fusionsproteine MLL•AF4 und AF4•MLL.....	30
2.5 Regulation wichtiger biologischer Prozesse über Proteindegradation	31
2.5.1 Regulation der Proteininstabilität durch Ubiquitylierung	31
2.5.2 Die E3 Ubiquitin Ligasen SIAH1 und SIAH2	34
2.6 Zielsetzung der Arbeit.....	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Wachstums-transformierendes Potential von AF4 und AF4•MLL in stabil transfizierten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF).....	37
3.1.1 Tetracyclin-induzierbares Expressionssystem in MEF Zellen	37
3.1.2 Transfektion der murinen Linie MEF/tTA.....	39
3.1.3 Charakterisierung der stabil transfizierten MEF/tTA Linien	42
3.1.4 Analyse transfizierter MEF/tTA Linien im <i>Focus Formation Assay</i>	44

3.2	Identifikation der Proteine SIAH1 und SIAH2 als Interaktionspartner von AF4	47
3.2.1	Analyse des AF4 Proteins in <i>Yeast Two-Hybrid</i> Experimenten.....	47
3.2.2	Verifizierung der Interaktion zwischen dem AF4•N Protein und den SIAH1 und SIAH2 Proteinen in Hefe	51
3.3	Interaktion des AF4•N Proteins mit den SIAH1 und SIAH2 Proteinen <i>in vitro</i>	53
3.4	Interaktion des AF4•N Proteins mit dem SIAH1 Protein <i>in vivo</i>	56
3.5	Regulation der AF4•N Proteinstabilität durch SIAH1	59
3.6	Regulation der AF4 und AF4•MLL Proteinstabilität.....	64
3.6.1	Modifikation des pTARGET Expressionsvektors	64
3.6.2	Untersuchung der Proteasom-abhängigen Degradation des AF4 Wildtyp und AF4•MLL Fusionsproteins	65
3.6.3	Interaktion und Stabilisierung der proteolytischen Spaltprodukte der4•N und MLL•C	68
3.6.4	Verifizierung der intramolekularen der4•N und MLL•C Proteininteraktion	70
3.6.5	Stabilität des der4•N/MLL•C Komplex in t(4;11)-abgeleiteten Zell-Linien.....	72
3.7	Pathomolekulares Modell zur Entstehung einer t(4;11)-assoziierten Leukämie.....	73
4	Diskussion	75
4.1	Definition des Wildtyp AF4 Proteins und des AF4•MLL Fusionsproteins als Proto- bzw. Onkoprotein	75
4.2	Regulation der AF4 und AF4•MLL Proteinstabilität über die E3 Ubiquitin Ligase SIAH1	77
4.3	Diskussion des pathomolekularen Modells zur Entstehung einer t(4;11)-assoziierten Leukämie	80
5	Material und Methoden	84
5.1	Material	84
5.1.1	Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen	84
5.1.2	Allgemeine Puffer und Lösungen	88
5.1.3	Verwendete Organismen.....	88
5.1.4	Synthetische Oligonukleotide	91
5.1.5	Vektoren und Plasmide	93
5.1.6	Antikörper	96
5.2	Molekularbiologische Methoden.....	97
5.2.1	Standardmethoden	97
5.2.2	Sequenzanalysen	98
5.3	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine.....	98
5.3.1	Glutathion-S-Transferase (GST) fusionierte Proteine.....	98
5.3.2	<i>In vitro</i> Transkription und Translation.....	99
5.3.3	GST Pulldown Assay	99
5.3.4	FAR Western Blot Analyse.....	100

5.4	Arbeiten mit Hefen	101
5.4.1	LiAc-Transfektion von Hefezellen	101
5.4.2	<i>Yeast Two-Hybrid Screen</i> und <i>MATCHMAKER Library</i>	102
5.4.3	Urea/SDS-Methode zur Preparation von Hefeextrakt.....	103
5.4.4	Plasmidisolierung aus Hefe.....	104
5.4.5	β -Galaktosidase Test (<i>Filter Lift Assay</i>).....	105
5.5	Arbeiten mit Säugerzellen	106
5.5.1	Transfektion der murinen Linie MEF/tTA und anschließende Selektion.....	106
5.5.2	MTT-Assay.....	106
5.5.3	Focus Formation Assay.....	107
5.5.4	Transiente Transfektion der 293T Zell-Linie mit der CaPO ₄ -Methode	107
5.5.5	Herstellung von Gesamtextrakt aus 293T Zellen	108
5.5.6	Immunopräzipitation	109
6	Abkürzungen	110
7	Literaturverzeichnis	112

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	<i>MLL</i> und <i>AF4</i> Genstrukturen und genauere Darstellung der beiden Bruchpunktsregionen	10
Abbildung 2-2:	Darstellung der Sequenz-abgeleiteten Proteinstrukturen von <i>MLL</i> und <i>Trithorax</i>	17
Abbildung 2-3:	Darstellung der proteolytischen Spaltung des <i>MLL</i> Proteins durch Taspase1 und anschließende Komplexierung der Proteinfragmente <i>MLL•N</i> und <i>MLL•C</i>	19
Abbildung 2-4:	Homologievergleich der Proteine <i>AF4</i> , <i>Lilli</i> und <i>MLL•AF4</i> (der11).....	24
Abbildung 2-5:	Schematische Darstellung der beiden Modelle zur Transaktivierung durch <i>MLL</i> Fusionsproteine (So, 2003)	29
Abbildung 2-6:	Schematische Zusammenfassung der spezifischen Ubiquitin-Modifikation (A) und der anschließenden Proteindegradation über das 26S Proteasom (B)	33
Abbildung 3-1:	Schematische Darstellung des Linkers <i>SFI</i> mit seinen Schnittstellen.....	38
Abbildung 3-2:	Restriktionsanalyse der in die Expressionsvektoren <i>pUHD10-3Sfi</i> und <i>pUHD10-3</i> klonierten cDNA Kassetten.....	39
Abbildung 3-3:	Hygromycin B-Toleranz von MEF/tTA Zellen	40
Abbildung 3-4:	Schematische Darstellung der induzierbaren Expressionskonstrukte	41
Abbildung 3-5:	Charakterisierung der MEF/tTA Linien durch genomische und RT-PCR.....	42
Abbildung 3-6:	MEF/tTA Linien im <i>Focus Formation Assay</i>	45

Abbildung 3-7:	Zusammenfassung der <i>Yeast Two-Hybrid Screens</i> mit Teildomänen des AF4 Proteins	49
Abbildung 3-8:	Protein-Interaktions Studien zwischen AF4•N und SIAH1 bzw. SIAH2 in Hefe	52
Abbildung 3-9:	Zusammenfassung der FAR Western Blot Analysen.....	54
Abbildung 3-10:	GST <i>Pulldown</i> Experimente	55
Abbildung 3-11:	Bestimmung der Transfektions-Effizienz von 293T Fibroblasten.....	57
Abbildung 3-12:	Co-Immunopräzipitations Experimente mit dem AF4•N und SIAH1 Protein.....	58
Abbildung 3-13:	SIAH1 Binde-Motiv PxAxVxP innerhalb der hochkonservierten ALF Domäne des AF4 Proteins	60
Abbildung 3-14:	SIAH1-vermittelte AF4•N Proteindegradation	61
Abbildung 3-15:	Darstellung des SIAH1-vermittelten AF4•N Proteinabbaus über den Proteasom-Komplex.....	62
Abbildung 3-16:	Schematische Darstellung des Sfi-Linkers mit seinen Schnittstellen.....	65
Abbildung 3-17:	Proteasom-abhängiger Abbau von AF4	66
Abbildung 3-18:	Untersuchung der Proteinestabilität des AF4•MLL Fusionsproteins	67
Abbildung 3-19:	Darstellung des der4•N/MLL•C Komplex - Interaktion und Stabilisierung der proteolytischen Spaltprodukte der4•N und MLL•C.....	69
Abbildung 3-20:	Darstellung der SIAH1 Proteininteraktionen mit AF4, <i>full-length</i> AF4•MLL und dem der4•N/MLL•C Komplex.....	70
Abbildung 3-21:	Untersuchung des der4•N/MLL•C Komplex in t(4;11) Leukämie Zelllinien.....	72
Abbildung 3-22:	Schematische Darstellung der prozessierten Proteinkomplexe für MLL und AF4•MLL.....	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3-1:	Induzierbare MEF/tTA Zell-Linien und deren Analyse.....	43
Tabelle 3-2:	Überblick über die verwendeten Klonierungs- und Kontrollplasmide	48
Tabelle 3-3:	Isolierte cDNA Sequenzen aus dem <i>Yeast Two-Hybrid Screen</i> mit dem AF4•N Protein als <i>bait</i>	50

1 Zusammenfassung

Reziproke chromosomale Translokationen sind häufig mit Leukämien und Lymphomen assoziiert und gelten in vielen Fällen als Ursache der Erkrankung. Die reziproke Translokation t(4;11) findet man hauptsächlich bei Kleinkindern, die an einer akuten lymphatischen Leukämie erkrankt sind, aber auch bei älteren Patienten mit einer Sekundärleukämie. Die leukämischen Blasten dieser Patienten sind meist gegen konventionelle Therapiekonzepte resistent, was zu einer ungewöhnlich schlechten Prognose führt.

Die Chromosomenbande 11q23 ist an einer Vielzahl chromosomaler Translokationen beteiligt. Die dadurch erzeugten reziproken MLL-Fusionogene sind alle mit der Entstehung einer Hochrisikoleukämie korreliert. Für einige der dabei entstehenden Fusionsproteine konnte nach retroviraler Transduktion in hämatopoietische Vorläuferzellen gezeigt werden, dass sie onkogenes Potential besitzen und eine myeloische Leukämie in transgenen oder transienten Mausmodellen initiieren können. Für die Produkte einer Translokation t(4;11) konnte dies bislang nicht erfolgreich untersucht werden. Bei der Translokation t(4;11) werden die beiden Partnergene *MLL* und *AF4* so miteinander verknüpft, dass auf den neu gebildeten Derivatchromosomen zwei Fusionsgene (*MLL•AF4* und *AF4•MLL*) mit einem intakten Leserahmen entstehen. Da man in den leukämischen Blasten im Regelfall beide Fusionstranskripte findet, nehmen wir an, dass beide Genprodukte zur Fehlregulation und Entartung der Zelle beitragen.

Um den potentiell onkogenen Wirkmechanismus der t(4;11) Translokation zu untersuchen, wurde ein induzierbares Expressions-System in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) etabliert. Anhand dieses Zellsystems gelang es das potentielle onkogene Potential der Fusionsproteine *MLL•AF4* und *AF4•MLL*, bzw. des Wildtyp *AF4* Proteins in *Focus Formation Assays* sichtbar zu machen. Dabei konnte die Bildung zellulärer Foci eindrucksvoll für das Wildtyp *AF4* Protein und das *AF4•MLL* Fusionsprotein dargestellt werden. Das *MLL•AF4* Fusionsprotein war nicht in der Lage den Verlust der Kontaktinhibition und damit Focus-Bildung in den Zellen zu initiieren. Die anschließende Definition des *AF4* Wildtyp- und *AF4•MLL*

Fusionsproteins als Proto-/Onkoprotein, führte zu der Arbeitshypothese, dass der N-terminale Bereich des AF4 Proteins (AF4•N) Wachstums-transformierendes Potential besitzt.

Aufgrund der vorliegenden Daten und zur genaueren Charakterisierung des AF4 Proteins wurden anschließend Interaktions-Studien mit dem AF4•N Protein durchgeführt, wobei die beiden E3 Ubiquitin Ligasen SIAH1 und SIAH2 als Interaktionspartner des AF4•N Proteins identifiziert wurden. E3 Ubiquitin Ligasen sind wichtige Bestandteile der Ubiquitinylierungs-Maschinerie und der damit verbundenen proteasomalen Degradation. Dabei sind die SIAH Proteine, wie alle E3 Ubiquitin Ligasen, für die Spezifität der Proteasom-abhängigen Degradation verantwortlich, indem sie über ihre Substrat-Binde Domäne im C-Terminus mit den abzubauenen Targetproteinen interagieren.

Die spezifische Interaktion der SIAH Proteine mit dem AF4•N Protein konnte in unabhängigen Experimenten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt werden. Durch den Einsatz des Proteasom-Inhibitors MG132 konnte zudem der effiziente, SIAH1-vermittelte und Proteasom-abhängige Abbau von AF4•N demonstriert werden. Mit weiterführenden Experimenten konnte auch für das Wildtyp AF4 Protein und für das AF4•MLL Fusionsprotein eine Regulation der Proteinstabilität über das SIAH1 Protein festgestellt werden. Eine SIAH1-vermittelte Degradation ist jedoch nur auf das AF4•MLL *full-length* Fusionsprotein beschränkt. Eine proteolytische Spaltung des AF4•MLL Fusionsproteins durch die Protease Taspase1 innerhalb des MLL Fusionsanteils führte zur Bildung eines stabilen der4•N/MLL•C Proteinkomplexes und dessen Akkumulation in den Zellen.

Basierend auf diesen Ergebnissen konnte für t(4;11) Translokationen ein erster pathomolekularer Mechanismus zur Leukämie-Entstehung aufgezeigt werden. Dieser beruht im wesentlichen auf der Akkumulation des der4•N/MLL•C Proteinkomplexes, welcher sich der effizienten Kontrolle durch die E3 Ubiquitin Ligase SIAH1 entzieht. Dadurch wird der Wachstums-transformierende AF4•N Proteinanteil in die Lage versetzt sein onkogenes Potential zu vermitteln.

2 Einleitung

2.1 Chromosomale Translokationen

Ein Kennzeichen der meisten menschlichen Leukämien und Lymphome sind reziproke chromosomale Translokationen, die mit dem Erscheinungsbild der Krankheit assoziiert sind. Die Tatsache, dass distinkte Translokationen mit bestimmten Erkrankungen des hämatopoietischen Systems verbunden sind, ist eines der Hauptargumente dafür, dass solche Chromosomenaberrationen sogar ursächlich für eine Tumorentstehung verantwortlich sind. Desweiteren weisen die von solchen Ereignissen betroffenen Genorte beachtliche Gemeinsamkeiten auf. So werden in der Regel Gene verändert und dereguliert, die an wichtigen zellulären Differenzierungsprozessen beteiligt sind und deren Produkte in der Lage sind, mit anderen zellulären Proteinen zu interagieren (Rabbitts, 1999). Für solide Tumoren ergibt sich dagegen ein viel heterogeneres Bild, wobei Translokationen und andere chromosomale Veränderungen bei bestimmten Krankheitstypen verschieden ausfallen. Die Frage, inwieweit die Verteilung chromosomaler Translokationen für die Entstehung der Krankheit eine ursächliche biologische Relevanz reflektiert, führte dazu, chromosomale Translokationen nach Art ihres molekularen Erscheinungsbildes zu unterteilen. Danach sind *balancierte* Translokationen vor allem ein Kennzeichen für hämatologische Erkrankungen und *Ursache* der Krankheit, während *unbalancierte* Aberrationen erst sekundär in soliden Tumoren während der *Progressionsphase* auftreten (Johansson, 1996). Die Fragestellung bezüglich der ursächlichen biologischen Relevanz ist wichtig, nicht zuletzt für das Verständnis wie solche chromosomalen Translokationen zur Fehlregulation und Entartung einer Zelle beitragen. In hämatologischen Erkrankungen können Translokationen durch zwei verschiedene Prinzipien zur Aktivierung von Onkogenen und damit zur Immortalisierung der Zellen führen.

Erste Daten, wie eine reziproke Translokation zu einer Fehlregulation führen kann, resultierten aus der Untersuchung lymphoblastischer Leukämien. In den Zellen des Immunsystems findet man häufig Translokationen unter Beteiligung der Gene für die Antigen-Rezeptoren TCR α und TCR β (14q11), TCR γ (7q35), sowie IgH (14q32), Ig-

(2p12) und Ig- κ (8q24). Durch die chromosomale Umlagerung werden zelluläre Proto-Onkogene wie *c-MYC* (t(14;18)(q32;q21)) oder *BCL-2* (t(8;14)(q24;q32)) in den transkriptionellen Kontext eines immunzellspezifischen und effektiven Enhancers gebracht und dadurch aktiviert (Typ I Translokationen). Die Bruchpunkte der beteiligten Proto-Onkogene sind oft von Erkennungssequenzen für die Rekombinasen des Immunsystems flankiert, und es wird davon ausgegangen, dass die Translokation Folge einer fehlgeleiteten Aktion der immunzellspezifischen Rekombinations-Maschinerie ist (Garcia, 1991; Sanchez-Garcia und Rabbits, 1993). Damit kann sowohl aus dem Entstehungsmechanismus als auch aus der daraus resultierenden Fehlregulation abgeleitet werden, dass diese Art der Translokation auf bestimmte Zellen beschränkt ist.

Bei dem zweiten und weitaus häufigeren Typ der Translokationsentstehung werden die an den betroffenen Chromosomenloci liegenden Gene fusioniert. Dadurch entstehen neuartige Fusionsgene, die letztlich für die Entartung der Zellen verantwortlich sind (Typ II Translokationen). Ein prominentes Beispiel dafür ist die Translokation t(9;22), bei der das sogenannte Philadelphia Chromosom als Rekombinationsprodukt entsteht (Rowley, 1973; Bartram, 1985; Teyssier, 1985). Durch die chromosomale Umlagerung, die in Intronbereichen stattfindet, werden die N- bzw. C-terminalen Exons der beteiligten Gene *BCR* und *ABL* reziprok miteinander verbunden. Bleibt der Leserahmen erhalten, entstehen zwei chimäre Genvarianten (***Bcr•Abl*** und ***Abl•Bcr***) die zur Expression von tumorspezifischen Fusionsproteinen führen.

Die Forschung der vergangenen Jahre hat gezeigt, dass durch die translokationsbedingte Bildung von Fusionsgenen eine weitaus größere Anzahl von Proto-Onkogenen aktiviert wird, als durch Positionseffekte infolge einer spezifischen Translokation (Rabbits, 1994; Sanchez-Garcia, 1997). Dementsprechend wurden in myeloischen Leukämien und soliden Tumoren bisher nur Typ II Translokationen beschrieben. Obwohl an den Translokations-Bruchpunkten oft Gene gefunden werden, die für die Entwicklung und Differenzierung des jeweiligen Zelltyps bedeutsam sind (Rabbits, 1999), fehlen für diesen Translokationstyp noch weitgehend Vorstellungen über Mechanismen und Ursachen, die zur Translokation als Endprodukt führen.

2.2 Die Translokation t(4;11)(q21;q23)

Die chromosomale Translokation t(4;11)(q21;q23) ist ein Beispiel für Typ II Translokationen und wurde 1979 zum ersten Mal für einen pädiatrischen Fall einer akuten lymphoblastischen Leukämie beschrieben (Van den Berghe, 1979). Elf Jahre später konnte ein *yeast artificial chromosome* (YAC) identifiziert werden, welches den Bruchbereich auf dem Chromosom 11 überspannte und in FISH Experimenten mit beiden Derivatchromosomen hybridisierte (Rowley, 1990). Nachfolgende Kartierungsexperimente und die Subklonierung des YAC führten zur Isolierung des beteiligten Gens, das im Bereich 11q23 zwischen den Genen *CD3 ϵ* und *Thy-1* kartierte und den Namen *MLL* (Mixed Lineage Leukemia) erhielt (Ziemin van der Poel, 1991). Erste kodierende Sequenzen wurden 1992 publiziert, wobei das zugehörige Gen wegen einer auffälligen Homologie zum Trithorax-Gen aus *Drosophila* als *Htrx-1* (Human trithorax gene 1) bezeichnet wurde (Djabali, 1992). Die vollständige cDNA-Sequenz dieses Gens wurde später gleichzeitig von zwei Arbeitsgruppen publiziert und mit *ALL-1* (Acute Lymphoblastic Leukemia 1; (Gu, 1992)) bzw. *HRX* (human Trithorax; (Tkachuk, 1992)) benannt.

2.2.1 Klinische Eigenschaften t(4;11)-assoziierter Leukämien

Die Chromosomenbande 11q23 ist von einer Vielzahl chromosomaler Translokationen betroffen, die vorwiegend bei Säuglingen und Kleinkindern gefunden werden. Trotz einiger Gemeinsamkeiten sind diese Translokationen mit unterschiedlichen Erkrankungen assoziiert. So ist eine t(4;11) Translokation beispielsweise charakteristisch für eine Erkrankung im lymphatischen Zweig des blutbildenden Systems, wohingegen eine t(9;11) Translokation typischerweise in myeloischen Zellen vorkommt und die Translokation t(11;19) beide Linien betreffen kann. Insgesamt betrachtet, sind Leukämieerkrankungen im ersten Lebensjahr allerdings sehr selten und kommen in den USA mit einer durchschnittlichen Häufigkeit von 37 Fällen pro 1 Million Kleinkindern vor (Gurney, 1997). Etwa 2,5 bis 5% der pädiatrischen akuten lymphoblastischen Leukämien (ALL) fallen auf

Kleinkinder, der Anteil bei den akuten myeloischen Leukämien (AML) liegt zwischen 6 bis 14% (Felix, 1999). Dabei findet man in 80% der ALL-Fälle und 50% der AML-Fälle eine chromosomale Aberration unter Beteiligung des *MLL* Gens (Ross, 1998; Rowley, 1998). Bemerkenswert ist die relative Häufigkeit, mit der t(4;11) Translokationen bei den wenigen Kleinkind-ALLs gefunden werden, obwohl diese Translokation in absoluten Zahlen ebenso häufig bei Kleinkindern wie in älteren Patientengruppen vorkommt (Johansson, 1998). So liegt der Anteil an t(4;11)-positiven Leukämien im Kleinkindalter bei etwa 30 bis 40% (Heerema, 1999), während in höheren Altersgruppen nur etwa 5% der diagnostizierten Leukämien t(4;11)-assoziiert sind. Bei dieser Patientengruppe besteht in der überwiegenden Zahl der Fälle ein Zusammenhang mit einer vorausgegangenen Therapie nichtverwandter Neoplasien (Felix, 1995; Johansson 1998). Dies gilt insbesondere für Patienten, die infolge einer Behandlung mit Topoisomerase II-Hemmstoffen an einer Therapie-assoziierten Leukämie erkranken, wobei bei diesen Patienten meist eine AML, seltener eine ALL vorliegt (Bigoni, 1999).

Klinische Merkmale von t(4;11) positiven Leukämien sind neben dem meist geringen Alter zum Zeitpunkt der Diagnose, Hyperleukozytose ($>50 \times 10^9/l$), Hepatosplenomegalie, starke ZNS Infiltration, sowie insbesondere der schlechte Verlauf der Therapie, verbunden mit einer schlechten Prognose (Chen, 1993b; Rubnitz, 1996; Felix, 1999; Reaman, 1999). Obwohl die Zellen morphologisch als ALL klassifiziert werden, zeigen sie bei molekulargenetischen und immunologischen Untersuchungen eine Mischung von lymphoiden und myeloischen Markern. Die transformierten Zellen stammen also vermutlich von frühen Vorläuferzellen ab, die noch Differenzierungspotential für beide Linien des hämatopoietischen Systems aufweisen. Häufig gefundene myeloische Marker sind CD15 und CD65, sowie in einigen Fällen auch CD13 und CD33. Kennzeichen von frühen B-Zellen sind die Umlagerung des IgH-Locus, sowie die Expression von TdT, CD34 und CD19 (Cohen, 1991; Pui, 1991; Thirman, 1993; Greil, 1994). Vor allem die fehlende Expression von CD10 bei gleichzeitiger Anwesenheit von CD19 führt zur Klassifizierung der leukämischen Blasten als pro B-ALL.

Während die Heilungschancen für Kinder mit einer ALL in den letzten Jahren auf annähernd 80% gestiegen sind und auch für AMLs bei fast 40% liegen (Kersey,

1997; Pui, 2000), so gilt diese erfreuliche Tendenz nicht für solche Fälle, die den bestehenden Therapiekonzepten widerstehen. Das trifft, wie bereits erwähnt, besonders auf t(4;11)-positive Leukämien zu, die nach einer ersten Remission häufig ein Rezidiv bilden, das sich als resistent gegen weitere Behandlungsprotokolle erweist. Diese Charakteristika führen dazu, dass solche Patienten in die Klasse der Hochrisiko-Leukämien eingruppiert werden. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit einer Risiko-orientierten Therapie, die zwischen erfolgreicher Behandlung und dem Auftreten von Nebenwirkungen abwägen muss. Aufgrund der geringen Fallzahlen fällt es allerdings schwer, klare prognostische Faktoren zu definieren. Als signifikante Charakteristika für eine schlechte Prognose wurden, neben einem hohen Leukozytentiter und ZNS-Infiltration, das geringe Alter sowie ein Rearrangement des *MLL* Gens vorgeschlagen. Eine Studie der amerikanischen Children's Cancer Group kommt jedoch zu dem Ergebnis, dass in Fällen von frühkindlicher ALL ausschließlich t(4;11) Translokationen, nicht jedoch andere *MLL* Translokationen, mit einer extrem schlechten Prognose einhergehen. Die Diagnose einer Translokation t(4;11) korreliert dabei mit einem Alter unter 6 Monaten und fehlender CD10 Expression (Heerema, 1999; Reaman, 1999). Auch andere Untersuchungen zeigen, dass das Alter der Patienten bei t(4;11)-positiven Leukämien eine entscheidende Rolle spielt. So bestehen für Patienten im Alter unter 2 Jahren und über 40 Jahren nur geringe Heilungschancen, während die Überlebenschancen für Kinder zwischen 2 und 9 Jahren bei fast 75% liegt (Johansson, 1998). Ein weiterer diskutierter prognostischer Faktor ist das frühzeitige Ansprechen auf eine initiale Therapie. Demnach ist eine Restkonzentration von mehr als 25% leukämischer Blasten nach 1- bis 2-wöchiger Prednison-Therapie bereits ein Anzeichen für eine schlechte Prognose (Dördelmann, 1999). Einige Arbeiten weisen zudem darauf hin, dass es sich bei t(4;11)-positiven Leukämien um eine heterogene Risikogruppe handelt. Unklar ist allerdings, welche prognostische Bedeutung, wenn überhaupt, das gleichzeitige Auftreten von t(4;11) Translokationen und anderen Mutationen hat (Johansson, 1996; Cimino, 1997a).

Da eine klare Prognose, und damit eine Einteilung in die Hochrisiko-Leukämie-Gruppe, von der Art des 11q23 Rearrangements abhängt, ist die Etablierung einer effizienten molekularbiologischen Diagnostik unerlässlich. Herkömmliche Methoden zur Diagnose von *MLL* Rearrangements umfassen FISH und multiplex RT-PCR

Analysen, welche durch ein geringes Auflösungsvermögen und durch die Qualität der zu untersuchenden RNA extrem limitiert sind. PCR Analysen, basierend auf der Untersuchung genomischer DNA von Leukämie-Patienten, konnten erstmals für die Translokationen t(4;11) (Gillert, 1999; Reichel, 1999; Reichel, 2001) und t(9;11) (Langer, 2003) etabliert werden. Diese Untersuchungen ermöglichen die genaue Charakterisierung der genomischen Bruchpunkte und können zudem für DNA basierte MRD (minimale Resterkrankung; *minimal residual disease*) -Studien eingesetzt werden, da die chromosomalen Fusions-Sequenzen für jeden Patienten spezifisch sind. Vor kurzem wurde, ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe, eine neue und optimierte DNA-basierte Methode etabliert. Die Methode beruht auf LDI-PCR (long distance inverse PCR) Untersuchungen und gewährleistet nicht nur eine schnelle Identifikation von t(4;11) Rearrangements, sondern auch die Identifikation aller und damit auch unbekannter *MLL* Translokationen (Meyer, 2004).

2.2.2 Molekulare Untersuchungen der Translokation t(4;11) - Die beteiligten Gene

Die an der Translokation t(4;11) beteiligten Gene sind zum einen das *MLL* Gen auf Chromosom 11, und zum anderen das *AF4* Gen, welches auf Chromosom 4 lokalisiert wurde. Durch die Translokation werden die parental Chromosomen zu neuen Derivatchromosomen fusioniert. An den Fusionsstellen der Derivatchromosomen findet man das *Derivat 11* Gen (der11), bestehend aus dem N-terminalen Anteil des *MLL* Gens und dem C-terminalen Bereich des *AF4* Gens (*MLL/AF4*), und das reziproke *Derivat 4* Gen (der4), bestehend aus dem N-terminalen Teil des *AF4* Gens und dem C-terminalen Bereich des *MLL* Gens (*AF4/MLL*). Die Exon-Intron-Struktur der beiden Gene wurde bereits vor mehreren Jahren in unserer Arbeitsgruppe aufgeklärt (Nilson, 1996; Nilson, 1997).

Das menschliche *MLL* Gen erstreckt sich über einen Bereich von 92 kb auf dem Genlocus 11q23 und seine mRNA Sequenz stammt von 37 Exons (Nilson, 1996; Marschalek, 1997). Neben dem am häufigsten vorkommenden mRNA Transkript mit einer Länge von 15,5 kb können zwei weitere Spleiss-Varianten mit einer Länge von 13,5 kb und 5 kb detektiert werden, deren Funktion jedoch unbekannt ist (Tkachuk, 1992). Der offene Leserahmen des Gens umfasst 12.015 Nukleotide (Tkachuk, 1992;

Nilson, 1996) und kodiert für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 435 kDa (Abbildung 2-1).

Das menschliche *AF4* Gen (*ALL-1 fused gene on chromosome 4*; (Gu, 1992)), auch bezeichnet als *FEL* (*four eleven leukemia*; (Domer, 1993)), wurde erstmals in Verbindung mit einer *MLL*-Fusion in der Translokation t(4;11) beschrieben und stellt zudem einen der häufigsten Translokationspartner des *MLL* Gens dar. Anders als beim *MLL* Gen sind allerdings für das *AF4* Gen keine weiteren chromosomalen Translokationen bekannt. Die *AF4* Genstruktur erstreckt sich über einen Bereich von 300 kb auf dem Chromosom 4, Bande q21. Das 10,5 kb große mRNA Transkript wird von 23 Exons kodiert, wobei 4 der Exons für alternative erste Exons (1a1 -1a2, 1b oder 1c) kodieren (Nilson, 1997; Werner, Diplomarbeit 1999). Der offene Leserahmen der Transkripte FelA (Exons 1a) und FelB (Exon 1b) umfasst 1211 bzw. 1218 Aminosäuren (Nakamura, 1993) und kodiert für ein Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von etwa 130-140 kDa (Abbildung 2-1). Durch Verwendung einer alternativen Polyadenylierungsstelle im Intron 3 entsteht ein 2,8 kb großes Transkript, das in Anlehnung an die bestehende Nomenklatur als FelC bezeichnet wurde (Nilson, 1997). Das entsprechende Transkript kodiert für die *AF4* Exons 1-3 und kann zum AF4•N Protein translatiert werden.

Die Lage von Translokationsbruchpunkten konnte für 11q23 Rearrangements unabhängig vom beteiligten Partnergen zuverlässig in Southern Blot Analysen bestimmt werden. Auf genomischer Ebene kartierten fast alle Bruchpunkte innerhalb des *MLL* Gens in einem 8,3 kb großen *BamHI*-Fragment. Diese sogenannte "breakpoint cluster region" (bcr; (Gu, 1992)) wird von den Exons 8 und 14 flankiert (Nomenklatur nach Nilson, 1996). Da die Kartierung durch Southern Blot Analysen von vorhandenen Restriktionsstellen abhängt, war eine weitere Eingrenzung der Bruchpunkte mit dieser Methode nicht möglich. Durch die exakte Kartierung anhand genomischer PCR-Analysen, konnte die Bruchregion auf einen 6,1 kb großen Bereich zwischen den Exons 9 und 12 begrenzt werden (Reichel, 2001; Reichel, Dissertation 2000). Für das *AF4* Gen wurde die Bruchregion vergleichsweise viel später kloniert und sequenziert. Die Bruchpunkte kartieren innerhalb des *AF4* Gens ebenfalls in einem relativ kleinen, ca. 44 kb großen genomischen Bereich, der von den Exons 3 und 6 flankiert wird, wobei der Hauptanteil der Brüche im Intron 3 liegt (Reichel, 1999; Reichel, Dissertation 2000).

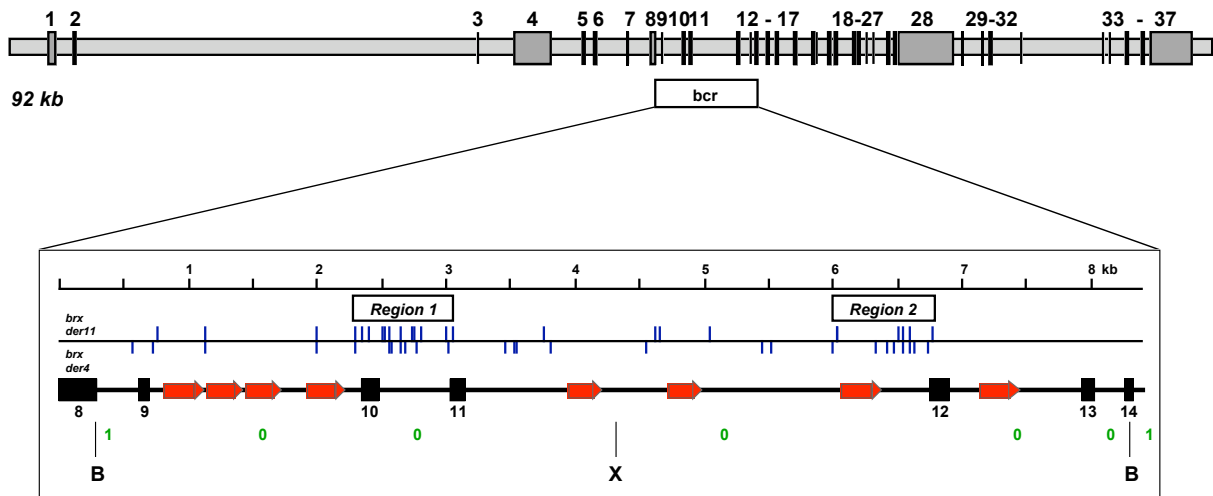
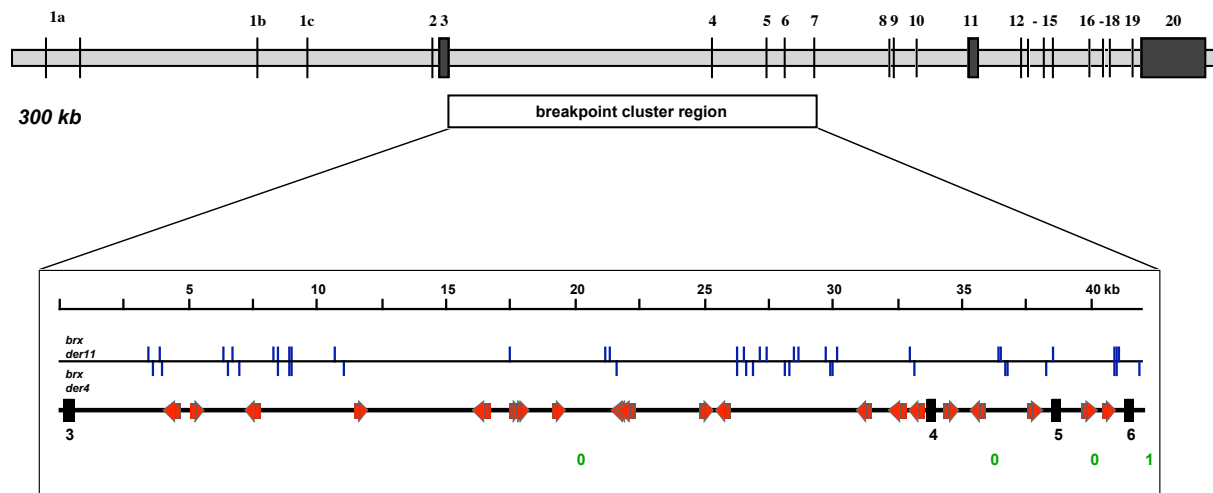
MLL / ALL-1 / HRX**AF4**

Abbildung 2-1: *MLL* und *AF4* Genstrukturen und genauere Darstellung der beiden Bruchpunktsregionen

Dargestellt ist jeweils die Exon-Intron Struktur der beiden Gene *MLL* und *AF4*. Die Bruchpunktsregionen (bcr) sind als weiße Boxen unter dem entsprechenden Gen markiert. Der Schaukasten unterhalb zeigt eine Vergrößerung der jeweiligen Bruchpunktsregion mit entsprechenden Strukturelementen. Die obere Skala gibt den genomischen Bereich in kb an. Darunter ist die Verteilung der Bruchpunkte und die Verteilung der repetitiven Alu-Elemente innerhalb der beiden Bruchpunktsregionen dargestellt. Unterhalb der Introns ist die Intron-Phase angegeben. Schaukasten oben: Die Bruchpunktsregion des *MLL* Gens wird von den Exons 8 und 14 flankiert. Die Verteilung der Bruchpunkte zeigt allerdings deutlich eine engere Clusterung zwischen den Exons 9 und 12. Schaukasten unten: Die Bruchpunktsregion im *AF4* Gen wird von den Exons 3 und 6 flankiert. Die Verteilung der Bruchpunkte im *AF4* Gen zeigt in keinem Bereich eine mit dem *MLL* Gen vergleichbare Clusterung.

Wie in Abbildung 2-1 dargestellt, ist die relative Anhäufung der genomischen Bruchpunkte auffällig und deutet darauf hin, dass bei reziproken Translokationen zwischen *MLL* und *AF4* die Chromosomen nicht beliebig miteinander fusionieren können. Ein Grund dafür könnte die positive Selektion von funktionellen Fusionsgenen sein, die eine spezifische Konstellation funktioneller Domänen der Ursprungsgene benötigen. Da eine maligne Funktion der Fusionsproteine einen entscheidenden Einfluss auf die Transformation der Zellen hat, lässt sich die Verteilung von illegitimen Rekombinationsereignissen so am besten erklären. Würden durch die Fusion essentielle Exons zerstört, könnte das Transformationspotential der Fusionsproteine nicht mehr gewährleistet sein. Mit der Aufklärung der Exon-Intron-Struktur und der Sequenzanalyse der Bruchregionen der beiden von der Translokation betroffenen Gene *MLL* und *AF4* wurde von unserer Arbeitsgruppe die Basis geschaffen, einige funktionelle Kriterien für krankheitsverursachende Translokationen zu definieren (vgl. auch 2.2.3). Ein Hauptkriterium stellt die Aufrechterhaltung des Leserasters dar (Marschalek, 1997). Introns werden je nach vorausgegangenem Exon unterteilt in Phase 0-, Phase 1- oder Phase 2-Introns. Das Ende eines Exons fällt dabei entweder mit dem Ende eines Kodons zusammen (Phase 0) oder kodiert noch für 1 (Phase 1) oder 2 Nukleotide (Phase 2) des nächsten Kodons. Das Triplet wird vervollständigt durch die ersten Nukleotide des folgenden Exons. Ein intaktes Leseraster der chimären Genvarianten kommt nur zustande, wenn gleichphasige Introns miteinander rekombinieren. Fusionieren Introns unterschiedlicher Phase miteinander, so kommt es unweigerlich zu einer Leserasterverschiebung und dadurch zu einem vorzeitigen Abbruch der Fusionsproteine. Zudem haben Untersuchungen gezeigt, dass ein verkürztes *MLL* Protein nicht ausreicht um Zellen zu transformieren und somit der *in frame* fusionierte Anteil des Partnergens essentiell ist (Corral, 1996; Lavau, 1997; Slany, 1998).

Die Analyse der beiden Bruchregionen zeigte, dass fast alle Introns vom Typ 0 sind und dementsprechend jeder Rekombinationsprozess in der Region zu funktionellen Fusionsgenen führt (Abbildung 2-1). Lediglich das *MLL* Intron 8 hat die Phase 1. In diesem Fall sollte ein Bruchpunkt im *AF4* Intron 6 liegen. Deutlich eingeschränkt ist die Partnerwahl, wenn die Bruchpunkte außerhalb der Bruchregion liegen. Da die Lokalisation von Bruchpunkten außerhalb dieses Bereichs aber bislang nur durch Southern Blot Analysen im *MLL* Gen erfolgte, ist nicht bekannt, welche Exons hier

miteinander fusioniert sind. Bemerkenswert ist, dass bislang kein Bruchpunkt innerhalb des *AF4* Intron 2 gefunden wurde, obwohl es sich um ein Intron der Phase 0 handelt. Das Intron ist mit 408 bp zwar klein, aber doch größer als das Intron 8 des *MLL* Gens (330 bp). Damit besteht die Möglichkeit, dass ein funktionelles und für die Leukämogenese wichtiges *AF4/MLL* Produkt die Anwesenheit des Exon 3 des *AF4* Gens erfordert und damit von der ALF Domäne im chimären Protein abhängt (Reichel, Dissertation 2000).

2.2.3 Entstehung einer Translokation t(4;11) - Hypothesen

Zur Klärung der erstaunlichen lokalen Häufung von Bruchpunkten innerhalb der Translokationsgene *MLL* und *AF4* wurden zwei extreme Hypothesen formuliert, die das Spektrum der möglichen Erklärungen eingrenzen (Marschalek, 1997). Die *Selektionshypothese* geht davon aus, dass Rearrangements im Prinzip beliebige Partnergene miteinander fusionieren können, jedoch nur ein kleiner Teil zur klonalen Expansion der betroffenen Zellen führt. Die überwiegende Mehrzahl der Translokationen, die sich möglicherweise ereignen, ist demnach pathologisch nicht von Bedeutung, da sie nicht zu einer malignen Transformation der Zellen führen und somit nie nachgewiesen werden. Die zweite Hypothese impliziert einen Zusammenhang zwischen der lokalen Verteilung der Bruchpunkte und einem möglichen Mechanismus der Translokationsentstehung. Diese *Hot-Spot-Hypothese* schlägt demnach vor, dass bestimmte genomische Regionen nicht zufällig in Translokationen verwickelt werden, sondern aufgrund ihrer strukturellen Beschaffenheit besonders anfällig für das Auftreten von illegitimen Rekombinationen sind. Die Sequenzanalyse beider Bruchregionen bot daher die Möglichkeit einige der "Hot Spot"-Theorien zur Entstehung der Translokation auf ihre Richtigkeit hin zu überprüfen.

Besonders auffällig ist die Häufung repetitiver Alu-Elemente innerhalb der bcr des *MLL* Gens (Gu, 1994; Marschalek, 1995). Bei einer statistischen Verteilung solcher Sequenzmotive (1 Alu-Element pro 5 kb) würde man in dem 8,3 kb großen Bereich nur ein bis zwei Alu-Elemente erwarten. Tatsächlich wurden in der Region zwischen Exon 8 und 14 aber acht Alu-Elemente (Abbildung 2-1) identifiziert und einige der

Bruchpunkte kartieren sogar innerhalb von Alu-Sequenzen, so dass eine Alu-Alu vermittelte homologe Rekombination als Ursache der Translokation diskutiert wurde. Zudem ist für das *MLL* Gen eine Alu-vermittelte Rekombination als Ursache einer internen Duplikation beschrieben (Strout, 1998; Wiedemann, 1999). In der Bruchregion des *AF4* Gens wurden insgesamt 17 vollständige und 9 verkürzte Alu-Elemente gefunden, wobei auch hier einige Brüche innerhalb von Alu-Sequenzen identifiziert wurden (Abbildung 2-1). In keinem einzigen Fall aber lagen die Bruchpunkte auf beiden Partnerchromosomen gleichzeitig innerhalb von Alu-Elementen, wie es für den Fall einer homologen Rekombination zwingend notwendig wäre (Reichel, 1999). Somit wird diese Hypothese der Translokationsentstehung, zumindest für die t(4;11) Translokation, nicht durch Daten gestützt.

Ein weiterer diskutierter "Hot Spot"-Mechanismus beruht auf der Anwesenheit von SAR-Elementen (scaffold attachment region) und Topoisomerase II-Konsensusbindestellen. Ausschlaggebend dafür war die klinische Beobachtung, dass in den meisten Fällen einer Therapie-induzierten AML (t-AML) nach Behandlung mit Topoisomerase II-Hemmstoffen ein rearrangiertes *MLL* Gen gefunden wurde. Der Zusammenhang zwischen der Einnahme von Topoisomerase II-Inhibitoren und dem Auftreten einer Translokation wurde durch die molekulare Untersuchung einer Patientenprobe mit einer therapie-induzierten Leukämie erhärtet. Der genomische Bruchpunkt lag direkt neben einer Topoisomerase II-Konsensusbindestelle (Domer, 1995). Außerdem konnten nach Teniposid-Behandlung von Zellen innerhalb der *MLL* Bruchregion Brüche induziert werden, die ebenfalls am Exon 12 des *MLL* Gens kartierten und mit der Topoisomerase II-Erkennungssequenz überlappten (Aplan, 1996). In weiterführenden Arbeiten wurde dies bestätigt, allerdings konnte ein Bruch in dieser Region auch dann erzeugt werden, wenn statt spezifischer Topoisomerase II-Hemmstoffe andere genotoxische Substanzen verwendet wurden (Stanulla, 1997). Die Autoren folgerten daraus, dass DNA-Strangbrüche durch eine Fragmentierung von übergeordneten Chromatinstrukturen nach Induktion der Apoptose auftreten können.

Vor diesem Hintergrund entstand die Vorstellung, dass die Verteilung von Bruchpunkten in verschiedenen Patientengruppen etwas mit der lokalen Chromatinstruktur zu tun haben könnte. Gestützt wurde diese Annahme vor allem durch

Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe um Strissel-Broecker, die eine Korrelation zwischen der Verteilung der Bruchpunkte und einer spezifischen Chromatinstruktur innerhalb der *MLL*-bcr nahe legen. Southern Blot Analysen der Bruchpunkte von 31 ALL und AML Patienten und 8 Patienten mit einer t-AML ergaben, dass 74% der *de novo*-Leukämien ihren Bruchpunkt in der 5' liegenden Hälfte der Bruchregion haben, während die Bruchpunkte der t-AML Patienten zu 75% in der 3' liegenden Hälfte kartieren (Strissel, 1996). In der telomer liegenden Region wurde zudem ein hochaffines SAR-Element (Exon 12 bis 22) kartiert, wobei innerhalb dieses Elements sechs Topoisomerase II-Bindestellen identifiziert wurden. Eine weitere Topoisomerase II-Stelle kartierte in der centromer liegenden Region, welche sich zwischen dem hochaffinen SAR und einem schwächeren SAR (Exon 6 bis 8) vor der Bruchregion befindet (Strissel, 1996). Nach der Kartierung weiterer 70 Bruchpunkte wurde das Modell dahingehend erweitert, dass auch die Brüche bei Kleinkindern unter einem Jahr präferenziell in der telomeren Region liegen (Cimino, 1997b). Aufgrund der starken Evidenz, dass bei Kleinkindern die Translokation bereits *in utero* auftritt (Gale, 1997) und der vergleichbaren Lage der Bruchpunkte in dieser Patientengruppe mit Therapie-induzierten Fällen wurde postuliert, dass die Exposition der Mutter mit Topoisomerase-Hemmstoffen während der Schwangerschaft mit einem erhöhten Risiko einer frühkindlichen Leukämie assoziiert ist. In diesem Zusammenhang wurde besonders die Gruppe der Bioflavonoide als Nahrungsmittel diskutiert (Ross, 1998; 2000; Strick, 2000).

Nach diesem Modell lassen sich die mit einem *MLL*-Rearrangement assoziierten Leukämien in zwei große Gruppen unterteilen. Die eine Gruppe umfasst die Kleinkinder unter einem Jahr (meist ALL mit t(4;11)) und die Erwachsenen mit einer Therapie-induzierten Leukämie (meist t-AML mit t(4;11) oder (9;11)). Beide Gruppen haben ihre Bruchpunkte gehäuft im Intron 11 des *MLL* Gens und die Entstehung der Translokation korreliert wahrscheinlich mit der Einnahme von Topoisomerase II-Hemmstoffen oder auch anderen genotoxischen Substanzen. Die zweite Gruppe umfasst die Kinder über einem Jahr und die erwachsenen Fälle ohne vergleichbare Vorgeschichte. Hier liegen die Brüche meist in der centromeren Hälfte der *MLL* Bruchregion und Hinweise auf mögliche Ursachen dieser Translokationen sind bislang nicht gefunden worden.

Speziell für t(4;11) Translokationen hat dieses Modell allerdings nur eingeschränkt Gültigkeit. Obwohl potentielle Erkennungsstellen für die Topoisomerase II auch in der Bruchpunktsregion des *AF4* Gens identifiziert wurden, ergab die Analyse der t(4;11)-Fusionsstellen beider Derivatchromosomen aus 60 Patienten und 3 Zelllinien, keinen konsistenten Zusammenhang mit Topoisomerase II-Erkennungsstellen. Außerdem konnte für die Bruchpunktsverteilung innerhalb des *AF4* Gens keine signifikante altersabhängige Korrelation festgestellt werden (Reichel, 1999; Reichel, 2001). Die Verteilung der Fusionsstellen innerhalb der *MLL* Bruchregion zeigte jedoch eine deutliche Häufung in den beiden zuvor beschriebenen Subregionen. Die überwiegende Mehrheit der bei Kleinkindern gefundenen Fusionsstellen fielen in das telomer gelegene Cluster vor Exon 12. In das centomer gelegene Cluster, welches die Exons 10 und 11 umfasst, fielen zumeist die bei älteren Kindern und Erwachsenen gefundenen Fusionstellen (Abbildung 2-1). Demnach bleibt zumindest für die *MLL* Bruchregion die "Hot Spot" Hypothese und die Annahme, dass die Vorgeschichte der Patienten die Lage des Bruchpunktes beeinflussen könnte, bestehen. Für beide Bruchregionen konnte zudem eine Korrelation zwischen der Verteilung der Bruchpunkte und der spezifischen Chromatinstruktur festgestellt werden. Der Vergleich zwischen den kartierten SAR-Elementen und der Lage von chromosomalen Bruchpunkten zeigte, dass DNA Bereiche mit einer starken SAR Funktion weniger Bruchpunkte enthalten, wohingegen Bereiche mit schwacher oder keiner SAR Funktion eine höhere Dichte an chromosomalen Bruchpunkten aufweisen. Daraus lässt sich ableiten, dass die spezifische Anordnung von ausgedehnten, hochaffinen SAR Bereichen, die von kleineren SAR freien Regionen flankiert werden, das Auftreten von lokal begrenzten DNA-Doppelstrangbrüchen begünstigt (Hensel, 2001).

Unabhängig von der Beteiligung bestimmter Sequenzmotive oder einer übergeordneten Chromatinstruktur an der Entstehung der Translokation, ergab die vergleichende Analyse beider Derivatchromosomen, dass die Bruchpunkte in allen untersuchten t(4;11) Fällen nicht kolokalisieren und damit zwar reziprok aber auf Feinstruktur-Ebene nicht balanciert sind. An den Fusionsstellen wurden durch den Vergleich mit der entsprechenden parentalen Sequenz Deletionen, Duplikationen, Inversionen sowie kurze Insertionen unbekannter Herkunft (*filler-DNA*) und kurze Bereiche überlappender Basen (*mini-direct-repeats*) zwischen den Genen *MLL* und

AF4 gefunden (Reichel, 1998; Reichel, 1999; Reichel, 2001). Die Entstehung solch komplexer Rearrangements schließt einen simplen Doppelstrangbruch auf beiden Partnerchromosomen und die anschließende kreuzweise Wiederverknüpfung nahezu aus. Vielmehr macht die Anwesenheit von sogenannter *filler DNA* und *mini direct repeats* an den chromosomalen Fusionsstellen die Beteiligung des "Nicht-homologen End-Ligations Reparaturwegs" (non-homologous end joining, NHEJ) an der Translokationsentstehung sehr wahrscheinlich (Roth, 1985; Roth und Wilson, 1986; Roth, 1989). Die Formulierung des "*DNA damage repair models*" für t(4;11) Translokationen fordert daher als initiales Ereignis einen spezifischen DNA-Schaden, wobei, mit Ausnahme der Patientengruppe mit einer Therapie-induzierten Leukämie, die Ursache dafür weitgehend im Dunkeln liegt. In einem zweiten Schritt führt der Versuch den DNA-Schaden durch Komponenten des NHEJ-Reparatursystems zu beheben zum Austausch der beteiligten Chromosomenenden (Reichel, 1998). Erste Untersuchungen zur Integrität des DNA End-Joining Reparatur-Systems in leukämischen t(4;11)-Zelllinien wurden bereits unternommen, blieben aber bisher ohne eindeutiges Ergebnis (Bursen, Diplomarbeit 1999; Reichel, Dissertation 2000). Allerdings konnte dieses Modell *in vivo* im Maussystem bestätigt werden. Wird auf zwei nicht-homologen Chromosomen der Maus ein ds-DNA Bruch induziert, so wird in ca. 25% aller Reperaturfälle eine chromosomale Translokation induziert (Richardson und Jasin, 2000).

2.3 Die Wildtyp-Proteine MLL und AF4

2.3.1 Funktionelle Domänen des *MLL* Genprodukts

Das *MLL* Gen kodiert für ein Protein von maximal 4.005 Aminosäuren, welches eine Vielzahl konservierter Domänen aufweist und modular aufgebaut ist. Die abgeleitete Proteinsequenz zeigt eine hohe Homologie zu Trithorax (Trx) (Gu, 1992; Tkachuk, 1992), einem wichtigen Differenzierungsprotein aus *Drosophila melanogaster*. Die Gesamthomologie zwischen Mensch und *Drosophila* beträgt innerhalb des C-Terminus 81% (Tkachuk, 1992). Zum Mll-Protein der Maus bestehen ebenfalls Homologien, wobei die Gesamtidentität sämtlicher Strukturmodule 90,8% beträgt (Ma, 1993).

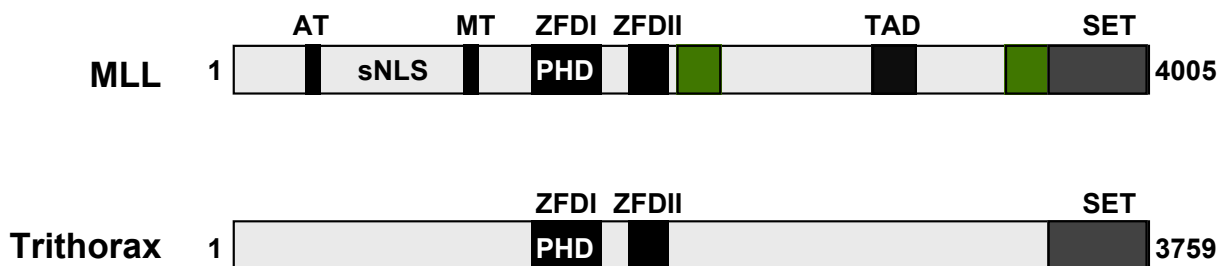


Abbildung 2-2: Darstellung der Sequenz-abgeleiteten Proteinstrukturen von *MLL* und *Trithorax*

Die beiden konservierten Bereiche mit der SET (Suppressor of variegation, Enhancer of zeste und Trithorax) Domäne und den Zink-Finger Domänen (ZFDI und ZFDII) sind dargestellt. AT: AT-Haken; MT: Methyltransferase Homologie Domäne; PHD (plant homeo domain): Zinkfinger-Motiv; TAD: Transaktivierungsdomäne.

Die am höchsten konservierte Domäne zwischen MLL und Trx umfasst 210 Aminosäuren und befindet sich am äußersten C-Terminus beider Proteine (Abbildung 2-2). Diese Domäne findet sich auch in den C-Termini der Genprodukte von *Suppressor of variegation su(var)3-9* und *Enhancer of zeste*. Die Übereinstimmung zwischen diesen Proteinen definiert die SET-Domäne (Suppressor of variegation, Enhancer of zeste und Trithorax). Su(var)3-9 gehört zu einer Gruppe

von Gendosis-abhängigen Regulatoren der "position effect variegation", einem Phänomen der Chromatinkondensation bei Polyänchromosomen. Enhancer of zeste ist im Gegensatz zu Trithorax ein negativer Regulator von homöotischen Genen in *D. melanogaster*. Eine mögliche gemeinsame Funktion von Proteinen mit einer SET-Domäne beschränkt sich demnach auf die Fähigkeit der transkriptionellen Regulation, sei es als Repressor oder Aktivator (Tschiersch, 1994). Protein-Interaktions-Studien mit der SET-Domäne von MLL/Trx bestätigten dies insofern, dass einer der identifizierten Interaktionspartner integraler Bestandteil des SWI/SNF "Chromatin Remodelling Komplexes" ist (Rozenblatt-Rosen, 1998). Eine zweite konservierte Region zwischen MLL und Trx umfasst zwei Zink-Finger Domänen. Im Gegensatz zu klassischen Zink-Fingern, die zu den am häufigsten vorkommenden DNA-Bindedomänen bei Transkriptionsfaktoren gehören, handelt es sich hier um sogenannte PHD-Finger (plant homeo domain). Die spezielle Faltung der cystidin- und histidinreichen Sequenzabschnitte ermöglicht Protein-Protein Interaktionen, wobei bislang jedoch unklar ist, welche Rolle diese Domäne für das MLL Protein spielt.

Mit Ausnahme einer konservierten Lokalisations-Sequenz für bestimmte funktionelle Kernbereiche (sNLS) gibt es im N-terminalen Drittel des MLL Proteins keine weiteren Homologien zu Trx. Allerdings weist das MLL Protein hier zwei weitere, distinkte Domänen mit potentieller DNA-Bindungsfähigkeit auf. Am äußeren Rand des N-Terminus liegen drei AT-Haken Motive, für die eine DNA-Bindeaktivität auch experimentell belegt ist (Zeleznik-Le, 1994). Ein cysteinreicher Sequenzabschnitt besitzt Homologie zu der DNA-(Cytosin-5) Methyltransferase und wurde in Anlehnung daran als MT Domäne bezeichnet. Entsprechende Domänen sind in der Lage zwischen methylierter und unmethylierter DNA zu unterscheiden und für die MT Domäne des MLL Proteins konnte unspezifische DNA-Bindung bereits nachgewiesen werden (Slany, 1998).

Neue experimentelle Daten belegen eine proteolytische Spaltung des MLL Proteins (Abbildung 2-3), wobei zwei ungleich große Peptidfragmente entstehen, die als MLL•N (p300) und als MLL•C (p180) bezeichnet wurden (Yokoyama, 2002; Hsieh, 2003b). Die Spaltung findet an zwei konservierten Protease-Erkennungssequenzen (CS1: QXD/GADD; CS2: QXD/GVDD) statt und führt zu einer Deletion von 52 Aminosäuren (Position 2667-2718). Unmittelbar nach der Spaltung durch die bereits

identifizierte Protease, Taspase1 (Hsieh, 2003a), wird das MLL•C Peptid hochgradig phosphoryliert (Yokoyama, 2002).

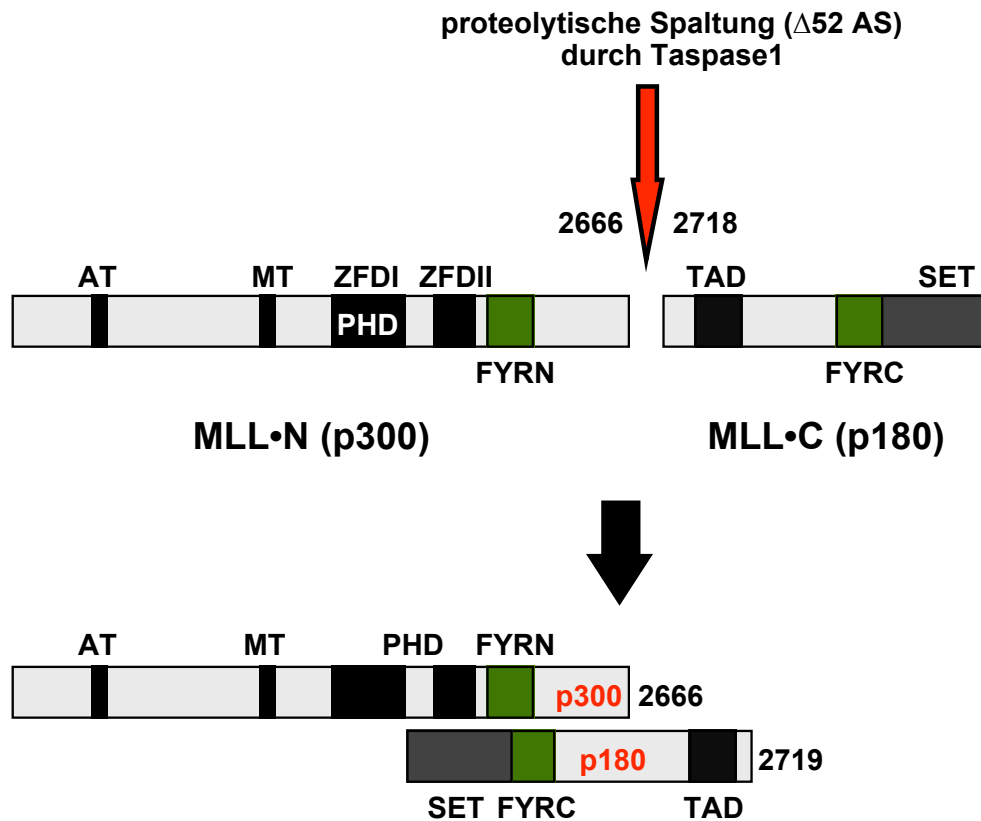


Abbildung 2-3: Darstellung der proteolytischen Spaltung des MLL Proteins durch Taspase1 und anschließende Komplexierung der Proteinfragmente MLL•N und MLL•C

Die prozessierten Peptide MLL•N und MLL•C haben entgegengesetzte transkriptionelle Aktivität und assoziieren über N- und C-terminal liegende intramolekulare Interaktions-Domänen. Die Dimerisierungsdomäne des MLL•N Peptids wird als FYRN-Region (AS 1979-2130) bezeichnet und interagiert mit der FYRC/SET-Domäne (AS 3656-3969) des MLL•C Peptids (Hsieh, 2003b). Die Interaktion der beiden Peptide führt zu einer Stabilisierung und einer korrekten subnukleären Lokalisation des intramolekularen MLL Proteinkomplexes. Damit ist gleichzeitig die Plattform für die Assemblierung eines MLL Multiprotein-Superkomplexes (MLL-MPSC), unter der Beteiligung von mindestens 27 weiteren Proteinen, geschaffen (Nakamura, 2002). Die identifizierten Proteine des MLL-MPSC

gehören Funktionsgruppen an, die Einfluss auf transkriptionelle Aktivitäten wie Genexpression, Replikation, DNA-Reparatur und Chromatin-Modifikation haben. Dazu zählen vor allem der schon erwähnte SWI/SNF-Komplex, der NuRD-Komplex, der transkriptionsreprimierende Sin3A-Komplex und Mitglieder der TAFII-Familie, die eine direkte Verbindung des MLL-MPSC zur basalen Transkriptionsmaschinerie herstellen. Neben dem MLL•C Peptid befinden sich im MLL-MPSC weitere Faktoren mit einer SET Domäne, sowie Proteine die zur Promotorerkennung beitragen und an der posttranskriptionellen RNA-Polyadenylierung beteiligt sind (Nakamura, 2002).

2.3.2 MLL als Kontrollprotein der Differenzierung

In *D. melanogaster* konnte gezeigt werden, dass das Trx-Protein eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung spielt. Homöotische Expressionsmuster, welche für eine präzise Segmentierung des Körperbauplans verantwortlich sind, werden in Trx-Mutanten zwar etabliert, können aber nicht aufrechterhalten werden (Kuzin, 1994). Letztlich führt dies zu einem ausgeprägten homöotischen Phänotyp mit gestörtem Körperbauplan. Basierend auf der Beobachtung, dass Trx-Proteine mit spezifischen Orten auf den Polytänchromosomen assoziiert sind, konnte gezeigt werden, dass Trx in Vorläuferzellen an transkriptionell aktive Chromosomenabschnitte bindet und dadurch eine stabile Vererbung des Expressionsmusters an die Tochterzellen während der Mitose gewährleistet (Paro, 1993; Tschiersch, 1994). Somit beeinflusst Trx die Expression bestimmter Gene nicht direkt, sondern ermöglicht die Etablierung eines sogenannten "transkriptionellen Gedächtnisses", welches über spezifische Histon- und DNA-Methylierungsmuster definiert wird. Bezeichnenderweise werden Proteine die einen transkriptionell aktiven Chromatin-Status aufrechterhalten, in der Trithorax-Proteingruppe (TrxG) zusammengefasst. Die antagonistisch agierenden Proteine der Polycomb-Gruppe (PcG) sind folglich für die stabile Vererbung von reprimierten Chromatinabschnitten verantwortlich. Neuere Arbeiten ermöglichten Einblicke in die Funktion des Trx-Proteins aus *D. melanogaster*. Die bis zu 2 MDa großen Trithorax-Proteinkomplexe sind aus vielen Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen zusammengesetzt. Darunter findet man unter anderem DNA-bindende Komponenten, Histon-Acetyltransferasen und chromatinmodifizierende Proteine, die der hoch konservierten SWI/SNF-Trans-

kriptionsmaschinerie angehören. Für die spezifische Bindung an die unterschiedlichen Chromatinabschnitte, sogenannte TREs (Trithorax Response Elements), scheint zudem die Zusammensetzung der TrxG-Komplexe entscheidend zu sein (Tillib, 1999). Die ersten Zielsequenzen konnten innerhalb des Ultrabithorax-Promotor (Homolog des *Hoxa7* Gens der Maus) identifiziert werden (Rozovskaia, 1999). Da in diesem Bereich Proteine der TrxG- und PcG-Komplexe zusammen mit Trx ko-lokalisieren, wurde die Vermutung bestätigt, dass TrxG- und PcG-Proteine über koordinierte molekulare Mechanismen die Chromatinstruktur und damit die Transkription der Zielgene beeinflussen.

In Anlehnung an den hohen Grad konservierter Sequenzmotive wurde lange Zeit vermutet, dass MLL Proteine das funktionelle Homolog zu Trx in Säugern darstellen. Erste funktionelle Hinweise stammen aus Transfektionsexperimenten mit Expressionskonstrukten für Teildomänen des MLL Proteins. Dabei zeigte die PHD Domäne transaktivierende und die MT Domäne Transkriptions-supprimierende Aktivität (Zeleznik-Le, 1994; Prasad, 1995). Eine konkrete Rolle des MLL Proteins als positiver Regulator der homöotischen Genexpression konnte im Mausmodell gezeigt werden. Ein homozygoter MLL *knock-out* ist bereits am Tag 10 der Embryonalentwicklung letal und die Embryonen zeigen zudem keine messbare HOX Genexpression. Bei heterozygoten Tieren führt die Dosisreduktion des MLL Proteins zu einer räumlich veränderten Expression der HOX Gene. Dementsprechend weisen die Tiere homöotische Transformationen des Skeletts auf, wobei insbesondere die thorakale Wirbelbildung verändert ist (Yu, 1995). Um zu klären, ob MLL im murinen System initial an der Aktivierung der Transkription oder deren Aufrechterhaltung beteiligt ist, wurde exemplarisch das *Hoxa7* Expressionsmuster untersucht (Yu, 1998). Dabei wurde bis zum Tag 9 der Embryonalentwicklung kein Unterschied in der Expressionsstärke zwischen *MLL^{+/+}* und *MLL^{-/-}* Embryonen festgestellt. Ab diesem Zeitpunkt konnte *Hoxa7* in *MLL^{-/-}* Zellen nicht mehr nachgewiesen werden, während in den Wildtyp-Embryonen das korrekte *Hoxa7* Expressionsmuster manifestiert wurde. Daraus lässt sich ableiten, dass ab diesem Zeitpunkt die *Hoxa7* Expression absolut von der Anwesenheit des MLL Proteins abhängig ist. Aktuelle Arbeiten zeigen zudem, dass MLL in humanen Zellen direkt an verschiedene Hox Genpromotoren (*HoxA9* und *HoxC8*) bindet und innerhalb dieser Promotorabschnitte an der Acetylierung der Histone H3 und H4, sowie der Methylierung von Histon H3 Protein

an Position K4 (Lysin 4) beteiligt ist (Milne, 2002; Nakamura, 2002). Die Methyltransferase-Aktivität konnte der C-terminalen SET Domäne des MLL•C Peptids zugeschrieben werden. Die H3-K4 Methylierung demonstriert zudem, dass MLL in der Tat an der epigenetischen Programmierung von Chromatin beteiligt ist, da eine gleichzeitige Methylierung durch die Polycomb Proteine Suv39H und E(z) blockiert wird, was eine Heterochromatisierung zur Folge hätte.

Da die Regulation hämatopoietischer Differenzierungsprozesse wesentlich von einer normalen Hox Genexpression abhängt (Look, 1997), kommt dem MLL Protein ebenfalls eine wichtige Rolle während der Proliferation hämatopoietischer Vorläufer zu (Fidanza, 1996; Hess, 1997). Ernst *et al.* konnten die Rolle des MLL Proteins für eine normale Hämatopoiese genauer definieren. Dazu wurden *Mll*-defiziente Zellen aus chimären Mäuseembryonen und erwachsenen Tieren untersucht. In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen, ist in erwachsenen Tieren die Anwesenheit von MLL für die Bildung lymphatischer und myeloischer Zell- Populationen von entscheidender Bedeutung. Überraschend hingegen ist die Beobachtung, dass die Bildung fötaler, hämatopoietischer Stammzellen (HSC: hematopoietic stem cell) und fötaler Vorläufer Populationen absolut von dem Vorhandensein des MLL Proteins abhängt (Ernst, 2004). Diese Experimente verdeutlichen einmal mehr, dass die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen MLL, der Hox Gen-Regulation und der Hämatopoiese von entscheidender Bedeutung ist, zumal Veränderungen der Hox Genexpression zunehmend für menschliche Leukämien beschrieben werden.

2.3.3 Funktionelle Domänen des *AF4* Genprodukts

Das *AF4* Gen wird in hämatopoietischen Zellen sowie allen untersuchten Geweben ubiquitär exprimiert (Chen, 1993a; Frestedt, 1996). Das AF4 Protein wurde im Zellkern lokalisiert (Nilson, 1997) und ist ein Mitglied der ALF (AF4, LAF4 und EMR2) Proteinfamilie. Ein viertes Mitglied repräsentiert das *AF5q31* Gen. Unabhängig voneinander wurden die Gene *LAF4* und *AF5q31* als Translokationspartner des *MLL* Gens in pädiatrischen pro-B ALLs indentifiziert (Taki, 1999; von Bergh, 2002). Mit Ausnahme von FMR2, ist folglich eine Fusion zwischen MLL und ALF

Familienmitgliedern mit der Entwicklung einer aggressiven pro-B ALL assoziiert. Die Inaktivierung des *FMR2* Gens (Chromosom X) durch einen Triplet-Expansionsmechanismus, geht mit einem mehr oder weniger stark ausgeprägten Phänotyp von mentaler Retardation einher (Chakrabarti, 1996; Gecz, 1996; Gu, 1996).

Ein Vergleich der AF4 Proteinsequenz mit LAF4, FMR2 und AF5 führte zur Charakterisierung fünf konservierter Domänen (NHD, ALF, pSer, NLS und CHD; vgl. Abbildung 2-4), wobei die biologische Funktion der einzelnen Domänen ungeklärt ist (Gecz, 1996; Gu, 1996; Nilson, 1997; Taki, 1999). In funktionellen Studien zeigten AF4 und LAF4 allerdings DNA-bindendes und transkriptionell aktivierendes Potential, was eine Funktion als nukleärer Transkriptionsfaktor nahe legt (Prasad, 1995; Ma und Staudt, 1996; Morrissey, 1997). Die transaktivierende Funktion konnte der hochkonservierten pSer Domäne zugeschrieben werden, welche nach einer t(4;11) Translokation Bestandteil des chimären MLL•AF4 Fusionsproteins ist. Desweiteren konnte in einem AF4 "knock-out" Modell gezeigt werden, dass dem murinem AF4 Protein eine Rolle während der Hämatopoiese zukommt (Isnard, 2000). Während die Mehrzahl der AF4-defizienten Mäuse symptomfrei überlebte, starben 20% der Mäuse innerhalb der ersten 10 Tage nach der Geburt. Obwohl die Todesursache nicht geklärt werden konnte, zeigten diese Mäuse eine Störung während der frühen B- und T-Zell Entwicklung. So war die Anzahl reifer B-Zellen im Knochenmark signifikant reduziert und im Thymus belief sich die Population CD4/CD8-doppelpositiver Zellen auf nur 30%. Die Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass AF4 im murinen System für die ausreichende Expression spezifischer Gene verantwortlich ist, die für eine korrekte lymphatische Entwicklung nötig sind. In diesem Zusammenhang, sei auch darauf hingewiesen, dass t(4;11) Translokationen in seltenen Fällen mit einer T-ALL assoziiert sein können (Johansson, 1998).

In aktuellen Studien konnte dem AF4 Protein eine weitere Rolle für das Zentral-Nervensystem zugeschrieben werden (Isaacs, 2003). In einer groß angelegten Mutagenese-Studie zur Untersuchung von Verhaltensmutanten wurde die sogenannte *robotic* Mausmutante isoliert. Die Mutante zeichnet sich durch einen gestörten Bewegungsablauf aus, der an die eingeschränkte Bewegungsmöglichkeit eines Roboters erinnert. Das verantwortliche Gen für den autosomal dominanten Phänotyp, wurde durch positionelles Klonieren als das murine AF4 Gen identifiziert,

welches eine Missense-Mutation (V294A) innerhalb der hoch konservierten ALF Domäne trägt. Als Resultat kommt es in den ersten Wochen nach der Geburt dieser Mäuse zu einem dramatischen Verlust von Purkinje-Zellen im Kleinhirn, was letztlich zu der stark eingeschränkten motorischen Funktion führt.

In *Drosophila melanogaster* wurde das *paired-rule* (Paar-Regel) Gen *lilliputian* (*lilli*) als einziges AF4 Homolog identifiziert (Tang, 2001; Wittwer, 2001). Das nukleäre Protein verfügt im zentralen und C-terminalen Bereich über die konservierten Domänen der ALF Proteine, wohingegen im N-Terminus die Proteinsequenz von der in Säugetieren konservierten Sequenz abweicht. Stattdessen verfügt Lilli in dem ausgedehnten N-Terminus über multiple Glutamin-reiche Bereiche, ein DNA-bindendes AT-Haken Motiv und eine potentiell transaktivierende Domäne der POU Klasse III Transkriptionsfaktoren (Wittwer, 2001). Interessanterweise hat das Lilli Protein damit mehr Strukturmerkmale mit dem chimären MLL•AF4 Fusionsprodukt gemein, als mit dem Wildtyp AF4 Protein (Abbildung 2-4).

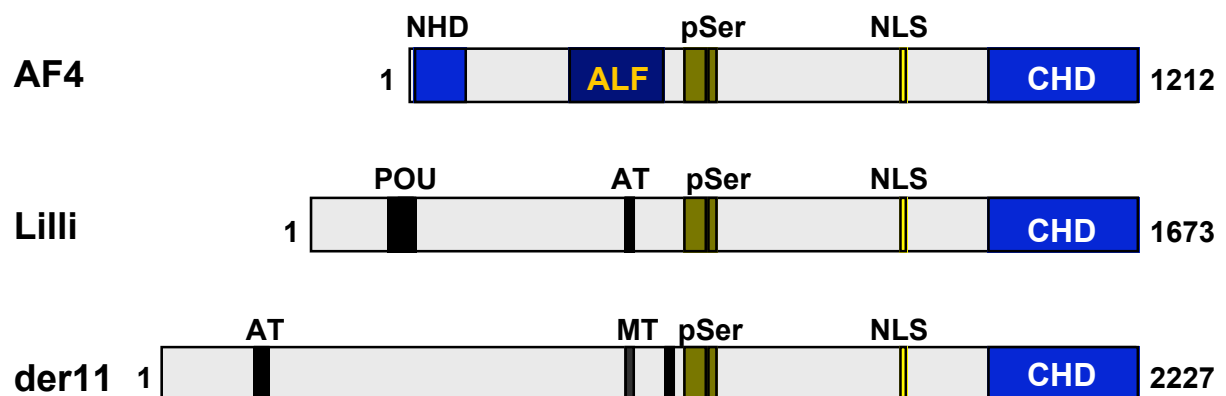


Abbildung 2-4: Homologievergleich der Proteine AF4, Lilli und MLL•AF4 (der11)

Die konservierten Domänen zwischen dem AF4 Protein und dem Lilli Protein beschränken sich auf die Serin-reiche Region (pSer), die NLS und die C-terminale Homologie Domäne (CHD). Mit dem AT-Haken Motiv (AT) und der POU Domäne (Klasse III Transkriptionsfaktor) weist das Lilli Protein größere Ähnlichkeit zum MLL•AF4 (der11) Fusionsprotein auf. NHD: N-terminale Homologie Domäne; ALF: hochkonservierte Domäne der AF4 Protein-Familienmitglieder; MT: Methyltransferase Homologie Domäne.

Eine genauere Charakterisierung zeigte, dass Lilli ein Target des Sevenless Rezeptors ist und an zwei verschiedenen Signalübertragungs-Prozessen beteiligt ist, bzw. einen konvergierenden Einfluss auf beide hat. Zum einen scheint Lilli als potentieller Transkriptionsfaktor die Expression einiger Komponenten des Ras/MAPK Signalweges zu regulieren, die ihrerseits die Signalübertragungsrate kontrollieren. Zum anderen steht Lilli als Zielprotein am Ende der PI3K/PKB Signal-Kaskade und aktiviert auf diesem Weg Wachstums- und Differenzierungsgene (Wittwer, 2001). In Säugetieren ist eine ähnliche Funktion des AF4 Proteins als Regulator von Zellwachstums- und Differenzierungsprozessen sehr wahrscheinlich und möglicherweise auch ein Grund für das geringere Gewicht der AF4-defizienten Mäuse bei der Geburt (Isnard, 2000). Aus diesen Ergebnissen lässt sich eine mögliche Funktion des MLL•AF4 Fusionsproteins für die Leukämogenese ableiten. Im Gegensatz zu MLL assoziierten Leukämien, findet man in anderen Leukämien und Lymphomen oftmals eine konstitutive Aktivierung des Ras/MAPK Signalweges (Mahgoub, 1998). Im Falle einer t(4;11) Translokation könnte die Expression des *MLL•AF4* Fusionsgens möglicherweise eine Ras-Aktivierung während der Transformation ersetzen.

2.4 Pathomolekulare Mechanismen der Leukämieentstehung nach einem 11q23 Rearrangement

Der Mechanismus der Leukämogenese durch die zahlreichen Translokationen des *MLL* Gens ist bislang nicht verstanden. In allen Fällen findet man allerdings ein Fusionstranskript, bei dem der 5'-Teil des *MLL* Gens durch die Fusion mit einem der vielen Partnergene von seinem 3'-Teil getrennt wird. Da die Fusionspartner zudem keine strukturellen Gemeinsamkeiten aufweisen, formulierte J. Rowley hieraus 1992 die Hypothese, dass das der11-Fusionsprodukt das biologisch relevante Onkogen darstellt. So wurde gezeigt, dass das der11 Chromosom in komplexen 3-Partner-Translokationen identisch ist mit dem in gewöhnlichen 2-Partner-Translokationen, während im reziproken Derivat Teile des entsprechenden Chromosoms mit dem 3. Partner fusioniert sind (Rowley, 1992). Die Feststellung, dass für manche *MLL* Rearrangements die Expression des reziproken Fusionsgens nicht nachgewiesen werden konnte, scheint diese Hypothese zu bestätigen. Allerdings konnte für t(4;11) Translokationen auf RNA und genomischer Ebene neben einem *MLL*•*AF4* Fusionsprodukt in ca. 80% der untersuchten Fälle ebenfalls ein funktionelles *AF4*•*MLL* Fusionsprodukt nachgewiesen werden (Downing, 1994; Janssen, 1994; Reichel, 2001). Dieser Anteil erscheint deutlich zu hoch, um ihn ohne eine biologische Notwendigkeit zu erklären. Im Umkehrschluss ist es sogar wahrscheinlich, dass ein intaktes *AF4*•*MLL* Fusionsprotein den Zellen einen Selektionsvorteil vermittelt und zur Entwicklung eines leukämischen Phänotyps notwendig ist.

2.4.1 Bedeutung der *MLL* Fusionsproteine für die Transformation

Für einige 11q23 Rearrangements konnte das onkogene Potential der *MLL* Fusionsproteine bereits im Tiermodell nachgewiesen und somit eine ursächliche Beteiligung an der Leukämogenese bestätigt werden. Die Translokation t(9;11) wurde im Mausmodell durch einen *knock-in* auf chromosomaler Ebene rekonstruiert. Die Expression des Fusionsproduktes *MLL*•*AF9* unter dem endogenen *MLL* Promotor führte nach 9 Monaten zur Ausbildung einer Leukämie, die mit einer

humanen AML vergleichbar war. Ein verkürztes MLL Produkt und eine MLL•myc Fusion zeigten diesen Phänotyp nicht (Corral, 1996). Die retrovirale Transduktion des *MLL•ENL* Fusionskonstrukts der Translokation t(11;19) in Knochenmarkszellen führte zur Immortalisierung hämatopoietischer Vorläuferzellen. Wurden die Zellen anschließend in SCID Mäuse injiziert, entwickelten diese eine myeloische Leukämie. Auch in diesem Experiment zeigten weder der N-Terminus des MLL Proteins noch ENL allein diesen onkogenen Effekt (Lavau, 1997; Slany, 1998). In späteren Arbeiten konnte auch für die Fusionsproteine MLL•ELL (Lavau, 2000b), MLL•AF10 (DiMartino, 1999) und MLL•CBP (Lavau, 2000a) onkogenes Potential beschrieben werden. Basierend auf diesen Arbeiten wurde für MLL Rearrangements ein *gain-of-function* Mechanismus angenommen, wobei dem Fusionspartner eine essentielle Funktion für die Transformation der Zellen zukommt. Dabei wurde angenommen, dass der MLL Anteil der chimären Proteine DNA-Bindung vermittelt, während der fusionierte Anteil für die Aktivierung der entsprechenden Loci verantwortlich gemacht wird. Für diese Hypothese spricht auch der Befund, dass MLL Fusionsproteine innerhalb der gleichen funktionellen Kernbereiche lokalisiert wurden wie das native MLL Protein (Butler, 1997; Yano, 1997).

Erste Einblicke wie MLL Fusionsproteine auf molekularer Ebene zur Leukämieentstehung beitragen, lieferten funktionelle Studien der fusionierten Proteine. Für die untersuchten Fusionsproteine AF9, ENL und ELL konnten jeweils Interaktionen mit anderen nukleären Proteinen festgestellt werden. Die identifizierten Interaktionspartner sind erwartungsgemäß in wichtige zelluläre Prozesse, wie die Kontrolle des Zellzyklus, die Transkription und die Signal-Transduktion eingebunden und geben Aufschluß darüber, wie die entsprechenden Fusionsproteine MLL•AF9 (Hemenway, 2001), MLL•ENL (Garcia-Cuellar, 2000; Garcia-Cuellar, 2001) und MLL•ELL (Shinobu, 1999; Simone, 2001) im Einzelnen zur Transformation beitragen. Die Ergebnisse bestätigten die Hypothese, dass ein aktives MLL Onkoprotein von den funktionellen Domänen beider fusionierter Proteine abhängt. In aktuellen Arbeiten konnte erstmals ein gemeinsamer Mechanismus für MLL Fusionen mit nukleären Proteinen demonstriert werden, wobei allein der biologische Prozess der transkriptionellen Aktivierung für das transformierende Potential zuständig ist. So ist die artifizielle Fusion des MLL N-Terminus mit der *Herpes simplex* VP16 Aktivierungsdomäne zur Immortalisierung von primären Knochenmarkszellen

ausreichend und induziert zudem einen Differenzierungsblock myeloischer Vorläufer, entsprechend einer authentischen MLL Fusion (So und Cleary, 2003; Zeisig, 2003). Die Annahme, dass es dabei unter anderem zu einer Transaktivierung bekannter MLL Zielgene kommt, wurde für einige MLL Fusionsproteine (MLL•ENL; MLL•AF6; MLL•ELL; MLL•AF10) bereits überprüft. In Anwesenheit dieser spezifischen MLL Fusionsproteine konnte die Expression der MLL-abhängigen Gene *Hoxa7*, *Hoxa9* und *Meis1* nachgewiesen werden. Daraus folgerten die Autoren, dass die Transformation myeloischer Vorläufer durch MLL Onkoproteine von der Expression der 3 genannten Faktoren abhängt (Ayton und Cleary, 2003; Zeisig, 2004).

Wie bereits angedeutet, kann dieses Modell zur Entstehung von Leukämien nur für MLL Fusionsproteine gelten, die transaktivierende Domänen bereitstellen. In der Mehrzahl der 11q23 Translokationen kommt es allerdings zu einem Rearrangement zwischen dem MLL Gen und Genen, die für cytoplasmatische Proteine kodieren. Da diese Proteine naturgemäß nicht über transaktivierende Domänen verfügen, muss ein anderer molekularer Mechanismus zur malignen Entartung der Zellen beitragen. Die Untersuchung einiger MLL Fusionen mit cytoplasmatischen Proteinen wie MLL•GRAF, MLL•FBP17, MLL•ABI1 und MLL•LASP1 zeigte, dass allein die Expression dieser Fusionskonstrukte nicht ausreicht um primäre Knochenmarkszellen zu transformieren (Strehl, 2003). Vor diesem Hintergrund wurde ein alternativer Mechanismus postuliert, bei dem eine transaktivierende Funktion durch die Di- oder Oligomerisierung der chimären MLL Fusionsproteine ermöglicht wird. Da die simple Verkürzung des MLL Proteins für eine maligne Transformation nicht ausreicht, geht man davon aus, dass die Dimerisierung durch entsprechende Domänen des Fusionspartners vermittelt wird. Für dieses Modell spricht insbesondere der Befund, dass MLL•*lacZ* "knock-in" Kontrollmäuse, wenn auch nach langer Latenzzeit, sowohl lymphatische als auch myeloische Leukämien entwickelten (Dobson, 2000). Das β -Galaktosidase Protein, das selbst keine Transkriptions-relevanten Domänen besitzt, bildet in seiner aktiven Form eine tetramere Struktur aus. In aktuellen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine induzierte Dimerisierung des verkürzten MLL Proteins für die Immortalisierung von Knochenmarkszellen ausreicht (Martin, 2003). Außerdem sind die von den cytoplasmatischen Fusionspartnern *AF1p* und *GAS7* kodierten Oligomerisierungs-Domänen sowohl notwendig als auch hinreichend für eine Transformation durch die

dazugehörigen MLL Fusionsproteine (So, 2003). Daraus wurde geschlossen, dass eine erhöhte Bindungs-Affinität und -Spezifität der dimerisierten MLL Fusionsproteine ebenfalls zur Aktivierung spezifischer MLL Zielgene führt. So konnte sowohl für den Fall der induzierten Dimerisierung des MLL N-Terminus als auch für die dimeren MLL Fusionsproteine eine Aktivierung der MLL-abhängigen Gene *Hoxa7*, *Hoxa9* und *Meis1* nachgewiesen werden (Martin, 2003; So, 2003). Diese Daten stützen die Annahme, dass eine Transformation durch MLL Fusionsproteine in direktem Zusammenhang mit der Etablierung eines aberranten *Hox* Genexpressions-Musters steht.

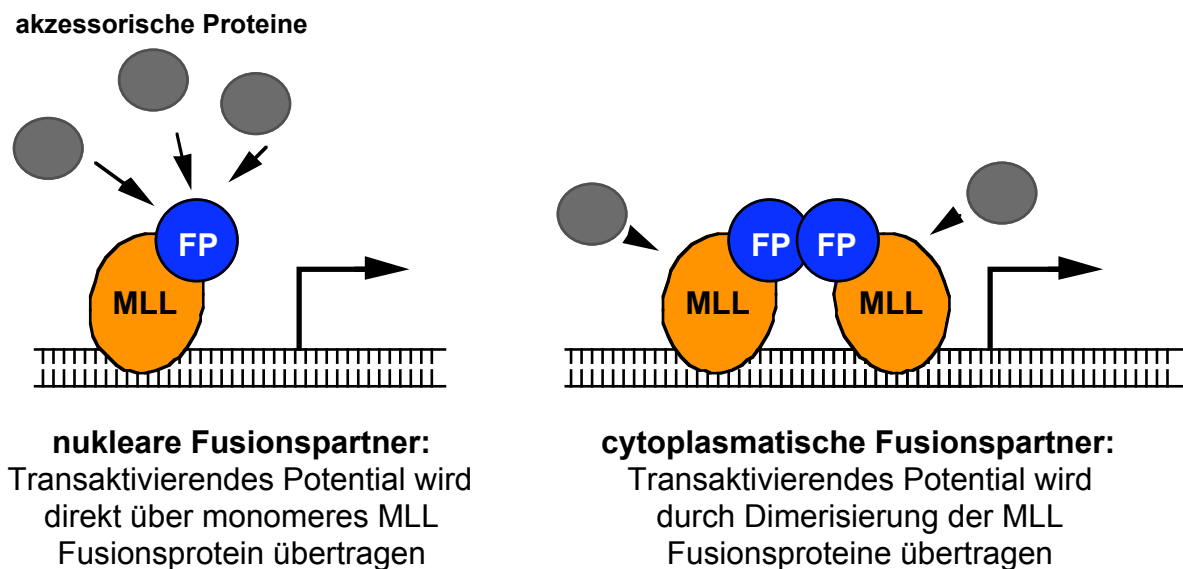


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der beiden Modelle zur Transaktivierung durch MLL Fusionsproteine (So, 2003)

2.4.2 Die t(4;11)-assoziierten Fusionsproteine MLL•AF4 und AF4•MLL

Abbildung 2-5 fasst die beiden derzeit gültigen Modelle zur Leukämieentstehung nach einem 11q23 Rearrangement zusammen. Allerdings besitzt keines der beiden Modelle Gültigkeit für t(4;11) Translokationen. Obwohl es sich bei dem fusionierten Partnerprotein AF4 um einen Transkriptionsfaktor und damit ein nukleäres Protein handelt, konnte für das MLL•AF4 Fusionsprotein in *Soft Agar* und *Focus Formation Assays* kein transformierendes Potential festgestellt werden (Bangerter, Dissertation 2001). Der Einsatz des MLL•AF4 Konstrukts in retroviralen Transduktions-/Transplantations-Assays blieb ebenso erfolglos. Die Expression des MLL•AF4 Fusionsproteins reichte für eine Immortalisierung primärer Knochenmarkszellen nicht aus (Lavau, 2004). Eine Dimerisierung des MLL•AF4 Fusionsprodukts kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da entsprechende Domänen im AF4 Protein fehlen. In einer aktuellen Studie wurde außerdem gezeigt, dass die Anwesenheit des MLL•AF4 Fusionsproteins keinen Einfluss auf die Hox Genexpression hat (Bertrand, 2003). Transfektions-Experimente mit einem induzierbaren MLL•AF4 Fusionskonstrukt zeigten allerdings einen dosis-abhängigen Effekt auf das Fortschreiten des Zell-Zyklus (Caslini, 2004). Die Erhöhung der MLL•AF4 Expression führte dabei zu einer abnehmenden Wachstumsrate und einer Akkumulation der Zellen in G1. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass in t(4;11) Translokationen das transformierende Potential nicht alleine von dem MLL•AF4 Fusionsprotein ausgehen kann. Deshalb muss im Falle der t(4;11) Translokation ein anderer molekularer Mechanismus zur Leukämieentstehung postuliert werden, wobei die Beteiligung des reziproken Fusionsproteins ebenfalls nicht auszuschliessen ist.

2.5 Regulation wichtiger biologischer Prozesse über Protein-degradation

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen einen allgemeinen Überblick über die Ubiquitinylierung und den damit verbundenen Abbau dieser Proteine über das 26S Proteasom erforderlich. Im Speziellen wird in den folgenden Ausführungen auf die beiden humanen E3 Ubiquitin Ligasen SIAH1 und SIAH2 eingegangen.

2.5.1 Regulation der Proteinstabilität durch Ubiquitinylierung

Poly-Ubiquitinylierung spezifischer Zielproteine stellt in Eukaryonten eine post-translationale Modifikation dar, welche für die Erkennung und anschließende Degradation der Proteine durch das 26S Proteasom verantwortlich ist. Das Ubiquitin-abhängige, proteolytische System stellt einen generellen Mechanismus zur Regulation der Proteinstabilität dar und spielt damit auch eine wichtige Rolle als Regulator für eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Eine wesentliche Aufgabe kommt dem Proteasom-abhängigen Abbau bei immunologischen und inflammatorischen Reaktionsprozessen zu. Der spezifische Abbau von Zielproteinen hat allerdings auch für zelluläre Prozesse wie Zellwachstum, Zellzyklus, Apoptose, Differenzierung und Entwicklung regulatorische Bedeutung. So werden einige Transkriptionsfaktoren wie p53 und c-Jun neben der transkriptionellen Kontrolle zusätzlich über die Proteinstabilität kontrolliert.

Das 26S Proteasom ist ein grosser Multiprotein Komplex (1500-2000 kD), der aus zwei Teilkomponenten besteht: dem katalytisch aktiven 20S Kernpartikel, sowie dem regulatorischen 19S Cap-Partikel, der an die Enden der 20S Untereinheit andockt. Die 20S katalytische Untereinheit besteht selbst wieder aus 28 Untereinheiten und bildet eine zylindrische Struktur, welche sich aus vier Heptamer-Ringen zusammensetzt. Dabei bestehen die beiden äußeren Ringe aus α -Untereinheiten, während die beiden inneren Ringe (enthalten die proteolytisch aktiven Zentren) von β -Untereinheiten gebildet werden. Der heterodimere Komplex ($\alpha_7\beta_7$) besitzt mindestens drei unterschiedliche katalytische Aktivitäten, wobei für die Trypsin-

ähnliche, die Chymotrypsin-ähnliche und die Peptidylglutamylopeptid-spaltende Aktivität jeweils verschiedene β -Untereinheiten verantwortlich sind. Die katalytisch wirksame Aminosäure in allen drei β -Untereinheiten ist ein aminoterminales Threonin, womit das Proteasom eine Threonin-Protease darstellt. Der 19S Cap-Komplex ist für die Erkennung, das Entfalten und das Einführen der Proteine in den 20S Zylinder des Proteasoms zuständig (Abbildung 2-6B). Die Erkennung abzubauenender Proteine beruht auf der Polyubiquitinierung, wobei das 76 Aminosäuren lange Ubiquitin über mehrere Enzyme (Ubiquitin-System) auf das abzubauenende Protein übertragen wird (Übersichtsartikel zur Funktion des 26S Proteasoms und des Ubiquitin-Systems: (Baumeister, 1998; Ciechanover, 2000; Almond und Cohen, 2002).

Die kovalente Verknüpfung eines Ubiquitin Moleküls mit dem abzubauenenden Protein erfolgt über das Ubiquitin-System in drei Schritten: (1) Zunächst erfolgt eine Aktivierung des Ubiquitin Monomers am C-terminalen Glycin über ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1). (2) Aktiviertes Ubiquitin wird anschließend über eines der vielen Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (Ubc oder E2), durch die Bildung eines E2-Ubiquitin-Thiolester Intermediats, auf das potentielle Proteasom-Substrat übertragen. (3) Dabei ist das abzubauenende Substrat von E3 Ubiquitin-Ligase gebunden. E3 Enzyme sind in der Lage, sowohl mit den E2 Proteinen als auch mit dem Zielprotein zu interagieren. Da die Zielproteine spezifisch von bestimmten E3 Ubiquitin-Ligasen in deren C-Termini gebunden werden, vermitteln diese damit auch die Spezifität der Ubiquitinylierungs-Reaktion. Im N-Terminus weisen alle E3 Ligasen eine spezielle RING Finger Domäne auf, welche für die Interaktion mit den E2 Proteinen verantwortlich ist (Abbildung 2-6A). Ein prominentes Beispiel für solch ein E3 RING Finger Protein ist das Mdm-2 Protein, welches für die Degradation von p53 verantwortlich ist (Honda, 1997; Fang, 2000). Die beiden Proteine SIAH1 und SIAH2, die im Folgenden genauer beschrieben werden, gehören ebenfalls zur Klasse der Ubiquitin-Ligasen (E3).

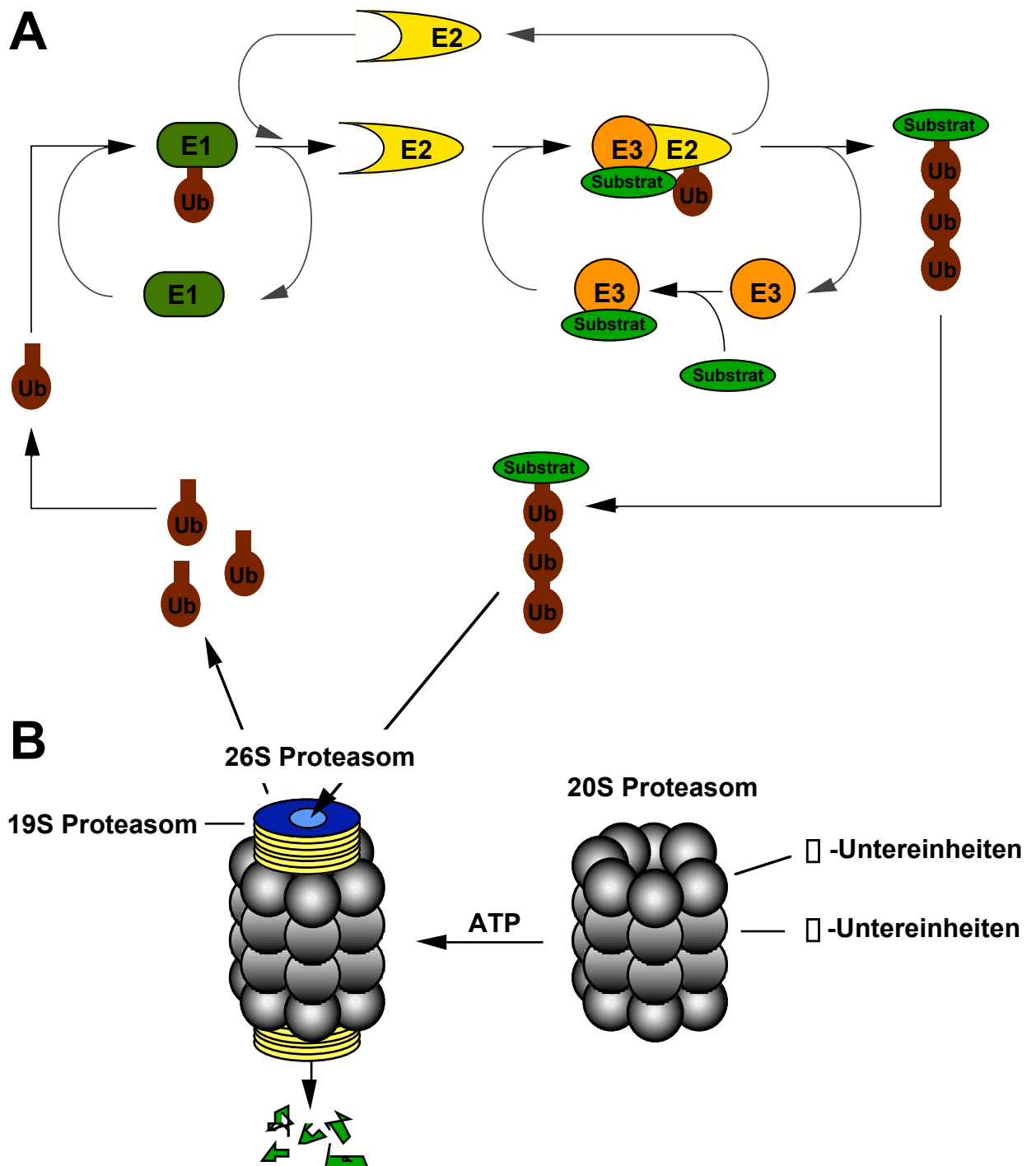


Abbildung 2-6: Schematische Zusammenfassung der spezifischen Ubiquitin-Modifikation (A) und der anschließenden Proteindegradation über das 26S Proteasom (B)

2.5.2 Die E3 Ubiquitin Ligasen SIAH1 und SIAH2

Die beiden Proteine SIAH1 und SIAH2 stellen die humanen Homologe des *Drosophila melanogaster* Proteins Sina (*seven in absentia*) dar (Hu, 1997a). Sowohl für die humanen SIAH Proteine als auch für das *Drosophila* Sina Protein wurde eine Funktion als Ubiquitin-Ligase beschrieben, wobei dem Sina Protein eine wichtige Rolle während der Augenentwicklung zukommt. Die Entwicklung der R7 Photorezeptorzelle in den Ommatidien des Komplexauges hängt entscheidend von der Anwesenheit des Sina Proteins ab (Carthew und Rubin, 1990). Zusammen mit dem Phyllopod Protein bindet Sina dabei an den transkriptionellen Repressor Tramtrack und bedingt dessen Ubiquitinylierung und Proteasom-abhängigen Abbau (Li, 1997; Tang, 1997). Tramtrack unterdrückt normalerweise die Differenzierung des R7 Photorezeptors, so dass die Degradation des transkriptionellen Repressors notwendigerweise die R7-Entwicklung einleitet.

Siah-ähnliche Sequenzen sind über alle Speziesgrenzen hinweg konserviert. Die SIAH Proteine der Säugetiere weisen untereinander eine hohe Homologie auf. So unterscheiden sich die beiden humanen Proteine SIAH1 und SIAH2 nur innerhalb ihrer N-Termini. Innerhalb des N-terminalen Bereichs verfügen beide Proteine über die essentielle RING Finger Domäne. Der C-Terminus hingegen gilt als Substrat-Binde Domäne (SBD), welche für die spezifische Interaktion und damit die Ubiquitin-Markierung und Proteasom-abhängige Degradation der Zielproteine verantwortlich ist (Hu, 1997a; Hu und Fearon, 1999). Derzeit bekannte SIAH1-interagierende Proteine sind der Netrin-1 Rezeptor DCC (*deleted in colorectal cancer*; (Hu, 1997b)), der transkriptionelle Aktivator OBF-1 (Boehm, 2001; Tiedt, 2001), der entwicklungs-spezifische Regulator NUMB (Susini, 2001), der transkriptionelle Repressor TIEG-1 (Johnsen, 2002) und die Proteine c-Myb (Tanikawa, 2000) und Kid (Germani, 2000). Spezifische SIAH2 Substrate sind der nukleäre Rezeptor und Ko-Repressor N-CoR (Zhang, 1998), der Neurotransmitter Synaptophysin (Wheeler, 2002), DCC (Hu, 1997b) und OBF-1 (Boehm, 2001). Auffällig ist hierbei, dass die Degradation mancher Proteine (DCC, OBF-1) sowohl durch SIAH1 als auch durch SIAH2 induziert werden kann, wobei der Abbau anderer Substrate spezifisch von einem der beiden Proteine abhängt. Kürzlich wurde das Synphilin-1 Protein, welches eines der Haupteinschlussproteine in den Lewy Körperchen bei Parkinson darstellt, als SIAH1

und SIAH2 Targetprotein identifiziert. Ein gestörter SIAH-vermittelter Abbau von Synphilin-1 ist demnach für die Bildung der Einschuß-Körperchen mit verantwortlich (Liani, 2004). Interessant ist auch, dass nicht alle SIAH Interaktionspartner dem proteasomalen Abbau zugeführt werden. So wird der GDP-Austausch-Faktor Vav-1 (Germani, 1999) von SIAH2 und das Hsp70/Hsc70 Bindeprotein BAG-1 (Matsuzawa, 1998) von SIAH1 zwar gebunden, aber nicht dem Abbau zugeführt. Die beiden Proteine binden zudem nicht im C-terminalen Bereich der SIAH Proteine sondern im Bereich der RING Finger Domäne im N-Terminus und inhibieren somit die Funktion der E3 Ubiquitin Ligasen.

Dem SIAH1 Protein, welches transkriptionell über p53 aktiviert wird (Fiucci, 2004), kommt zudem eine entscheidende Rolle innerhalb einer wichtigen Signaltransduktions-Kaskade zu. Durch ein Netzwerk von Proteininteraktionen, unter Beteiligung von SIAH1, SIP (Siah interacting protein), SKP1, Ebi und dem APC (adenomatous poliposis coli) Protein, konnte ein alternativer Signalweg zur Regulation der β -Catenin Proteinstabilität beschrieben werden (Liu, 2001; Matsuzawa und Reed, 2001). Da dieser Signalweg p53-induzierbar ist, wurde die β -Catenin Degradation in Zusammenhang mit aufgetretenen genotoxischen Schäden gestellt. Außerdem ist eine SIAH1 Überexpression mit einer p53-Aktivierung vergleichbar und somit auch mit einer Arretierung des Zellzyklus und der Induktion der Apoptose verbunden (Matsuzawa, 1998; Roperch, 1999; Relaix, 2000). Desweiteren konnte, in einer sehr eindrucksvollen Arbeit, der maligne Phänotyp verschiedener Tumor-Zellen durch die Expression eines SIAH1 Transgens unterdrückt werden. Dabei wurde die beschriebene Tumor-Reversion dem SIAH1-vermittelten und Proteasom-abhängigen Abbau von Onkoproteinen zugeschrieben (Tuynder, 2002). Aufgrund der dargelegten Erkenntnisse wurden die beiden E3 Ubiquitin-Ligasen SIAH1 und SIAH2 als Tumor Suppressor Proteine klassifiziert.

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, durch funktionelle Analysen das potentielle Wachstums-transformierende Potential der chimären Fusionsprodukte MLL/AF4 und AF4/MLL, die durch eine Translokation t(4;11) entstehen, zu untersuchen. Dazu sollten mögliche Funktionen der Derivatproteine experimentell erarbeitet werden, um eine Modellvorstellung über den leukämogenen Mechanismus der Leukämie zu entwickeln.

1. Mit Hilfe des induzierbaren tet-off Expressions-Systems sollte das onkogene Potential der Fusionsproteine MLL•AF4 und AF4•MLL, bzw. des Wildtyp AF4 Proteins, in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) untersucht werden. Die dazu verwendete MEF Zell-Linie exprimierte das dazu notwendige Tetracyclin-abhängige Transaktivatorprotein (tTA). Nach stabiler Transfektion der Tetracyclin-induzierbaren Expressionskonstrukte für *AF4*, *AF4•MLL*, *MLL•AF4* und *H-ras** sollten die erhaltenen Zell-Linien in An- und Abwesenheit von Tetracyclin im *Focus Formation Assay* untersucht werden.

2. Aufgrund der im *Focus Formation Assay* erhaltenen Ergebnisse sollte die biologische Relevanz des Wildtyp AF4 Proteins genauer charakterisiert werden. Dazu sollte insbesondere der Wachstums-transformierende N-terminale Bereich des AF4 Proteins (AF4•N) in Yeast-Two Hybrid Untersuchungen eingesetzt werden, um mögliche Interaktionspartner zu identifizieren.

3. Die Interaktion identifizierter AF4•N Bindepartner sollte anschließend in unabhängigen Experimenten verifiziert werden. Dazu sollten *in vitro* Untersuchungen, wie FAR Western und GST Pulldown Analysen, durchgeführt werden und in Säugerzellen sollte die Interaktion durch Immunopräzipitations Experimente dargestellt werden. Desweiteren sollten die biologische Relevanz dieser spezifischen Interaktionen durch biochemische und immunologische Experimente darauf hin überprüft werden, ob und welchen Einfluss sie für die Entstehung einer Leukämie nach einer t(4;11) Translokation besitzen.

3 Ergebnisse

3.1 Wachstums-transformierendes Potential von AF4 und AF4•MLL in stabil transfizierten murinen embryonalen Fibroblasten (MEF)

3.1.1 Tetracyclin-induzierbares Expressionssystem in MEF Zellen

Für die Untersuchung des transformierenden Potentials der beiden Fusionsproteine MLL•AF4 und AF4•MLL, einer Translokation t(4;11), wurde das von Gossen und Bujard *et al.* entwickelte *tet-off* System eingesetzt (Gossen und Bujard, 1992). Bestehend aus einem Vektor, der für das Tetracyclin-abhängige Transaktivatorprotein (tTA) kodiert, und einem weiteren, induzierbaren Expressionsvektor, in den das zu untersuchende Transgen kloniert wird, basiert das *tet-off* System in Säugerzellen auf der Co-Transfektion dieser beiden Vektoren und erlaubt dadurch eine regulierbare und spezifische Expression des Transgens in Abhängigkeit von Tetracyclin oder Doxycyclin, ein stabileres Tetracyclin-Derivat. Das Transaktivatorprotein ist ein Fusionsprotein bestehend aus dem N-terminalen Bereich des prokaryontischen Tet Repressors (TetR) und dem C-Terminus der Herpes simplex Virus VP16 Aktivierungsdomäne. Die Fusion der VP16 Domäne verleiht dem Tet Repressor Transkriptions-aktivierende Funktion. Der induzierbare Vektor verfügt über ein Tetracyclin Response Element (TRE), welches sich durch sieben hintereinander geschaltete Tet Operator Sequenzen (*tetO*) auszeichnet. Der verkürzte CMV Promotor ($P_{\min}CMV$) verfügt nicht über die starken Enhancer Elemente, die normalerweise mit dem *immediate early* CMV Promotor assoziiert sind, so dass eine effiziente Expression des Transgens allein von der Bindung des tTA Proteins an alle *tetO* Sequenzen abhängt. Tetracyclin bindet an den Transaktivator und bewirkt eine Konformationsänderung, die eine Bindung an die Tet Operatoren verhindert und damit die Transkription des Transgens inhibiert. Durch den Verzicht auf eine Resistenzkassette und die damit verbundenen Enhancer Elemente, ermöglicht der in der Arbeit verwendete, induzierbare TRE Vektor pUHD10-3 eine absolut genau kontrollierte Expression des Transgens. Um trotzdem

eine Selektion der transfizierten Zellen zu ermöglichen, wurden die entsprechenden Expressionskonstrukte jeweils mit dem Vektor pHMR272-Hyg, welcher eine Hygromycin-Resistenz (Hyg^R) vermittelt, co-transfiziert.

Die cDNA Konstrukte des Wildtyp *AF4* Gens als auch der chimären Fusionsgene *AF4•MLL* und *MLL•AF4* standen bereits als mobilisierbare *Sfi*-Kassetten in dem Plasmid pBluescript (pBS) zur Verfügung (Bangerter, Dissertation 2001). Da die multiple Klonierstelle (*mcs*) des Expressionsvektors pUHD10-3 keine *Sfi*-Schnittstelle aufweist, musste diese erst verändert werden.

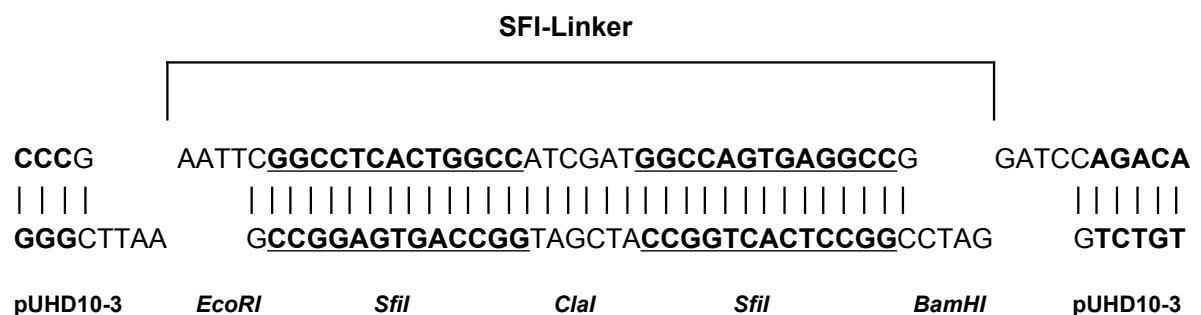


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des Linkers SFI mit seinen Schnittstellen
 Der ds Linker SFI ist in der Mitte der Abbildung dargestellt (SFI•3/SFI•5). Die Überhänge ermöglichten eine Klonierung über *EcoRI* und *BamHI* in den Vektor pUHD10-3. Durch Restriktionsverdau mit *ClaI* liess sich eine erfolgreiche Insertion des SFI-Linkers überprüfen. Anschliessender *SfiI*-Verdau machte das gerichtete Klonieren der Expressionskonstrukte möglich.

Dazu wurde in die *mcs* des pUHD10-3 Vektors über die *EcoRI*- und *BamHI*-Schnittstellen ein *SfiI*-Linker eingebracht (pUHD10-3Sfi), der eine gerichtete Subklonierung der cDNA-Kassetten für *AF4* (4,2 kb), *AF4•MLL* (9,1 kb) und *MLL•AF4* (6,9 kb) ermöglichte. Die Expressionskassette für *H-ras** (0,7 kb) wurde über die *BamHI*-Schnittstelle in den ursprünglichen Vektor pUHD10-3 kloniert. Abschließend wurden neben entsprechenden Restriktionsanalysen alle Klonierungen an den Vektor-cDNA-Übergängen mit vektorspezifischen Oligonukleotiden auf eine korrekte Insertion und Orientierung überprüft.

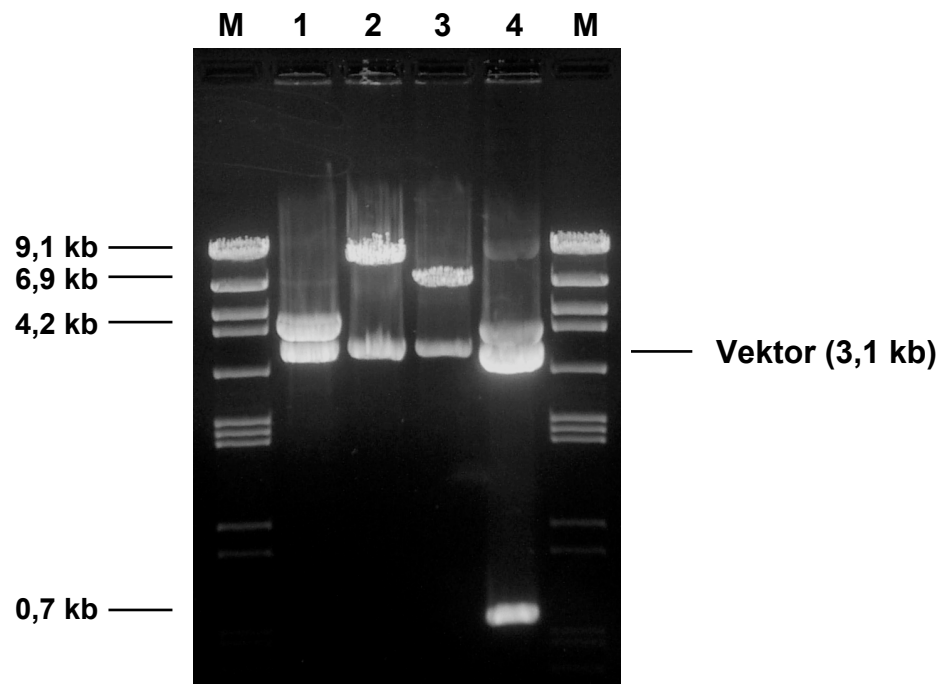


Abbildung3-2: Restriktionsanalyse der in die Expressionsvektoren pUHD10-3Sfi und pUHD10-3 klonierten cDNA Kassetten
 Auf dem 1%igen Agarosegel sind die umklonierten cDNAs von *AF4*, *AF4•MLL* und *MLL•AF4* nach *SfiI*-Verdau, sowie von *H-ras** nach *BamHI*-Verdau dargestellt. M: Größenstandard \square *Clal*; 1: *AF4* (4,2 kb); 2: *AF4•MLL* (9,1 kb); 3: *MLL•AF4* (6,9 kb); 4: *H-ras** (0,7 kb).

3.1.2 Transfektion der murinen Linie MEF/tTA

Die für die Transfektions-Studien verwendete Zelllinie MEF/tTA wurde käuflich erworben. Die Zelllinie verfügte bereits über eine stabile Integration des pTet-Off Vektors, welcher die Expression des Tetracyclin-abhängigen Transaktivators gewährleistete. Der Vektor verfügt über eine Neomycin-Resistenz (Neo^R), womit eine stabile Propagierung während der Zellteilung durch G418-Zugabe möglich ist. Vor der Co-Transfektion mit den induzierbaren Expressionskonstrukten und dem Hyg^R-Vektor wurde die Hygromycin-Toleranz der untransfizierten MEF/tTA Zellen bestimmt. Dazu wurden anhand des MTT-Tests Wachstumskurven aufgenommen, wobei die Überlebensrate nicht-transfizierter Zellen bei steigender Hygromycin-Konzentration gemessen wurde. Für Hygromycin ergab sich daraus eine Selektions-Konzentration von 300 µg/ml (Abbildung 3-3).

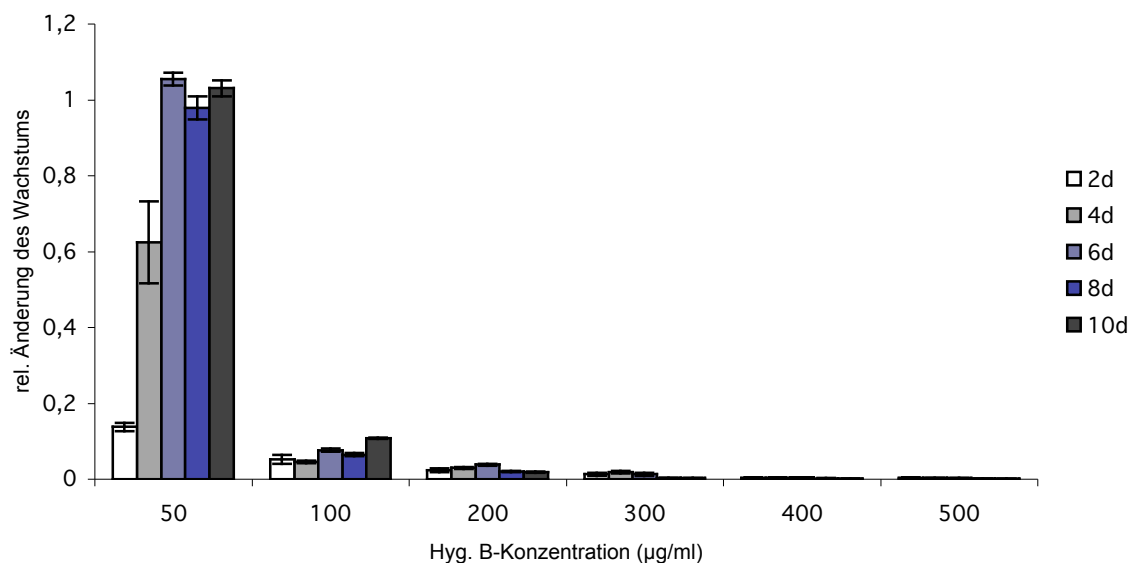


Abbildung 3-3: Hygromycin B-Toleranz von MEF/tTA Zellen

Bestimmt wurde die Konzentration, bei der nicht-transfizierte MEF/tTA Zellen nach 8 Tagen komplett absterben.

Im Anschluss wurden die in Abbildung 3-4 dargestellten Expressionkonstrukte für *AF4*, *AF4•MLL*, *MLL•AF4* und *H-ras** jeweils zusammen mit dem Hyg^R-Vektor über Lipid-vermittelten Gentransfer in die MEF/tTA Zellen eingebracht. Die Transfektionen wurden in Gegenwart von 10 µg/ml Doxycyclin (Tetracyclin-Derivat) durchgeführt, um vorläufig eine Expression der Transgene zu unterbinden. Nach drei Wochen wurden für jede Transfektion stabile Klone erhalten, welche unter Hygromycin-Selektion und Doxycyclin-Zugabe weiter expandiert wurden. Für jede transfizierte Zelllinie wurden ca. 30 individuelle Klone auf die Anwesenheit des jeweiligen Expressionskonstrukts hin untersucht, da eine Hygromycin-Resistenz auch durch die alleinige Anwesenheit des pHMR272-Hyg Vektors möglich war.

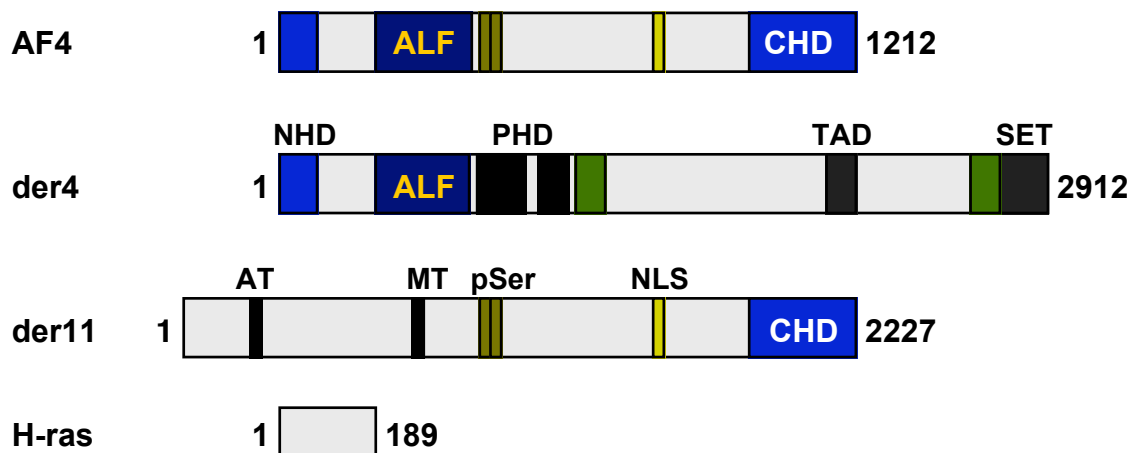


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der induzierbaren Expressionskonstrukte
 Dargestellt sind die Sequenz-abgeleiteten Proteinstrukturen der Tetracyclin-induzierbaren Transgene *AF4*, *AF4•MLL* (*der4*), *MLL•AF4* (*der11*) und *H-ras**. Das *der4* Fusionsprotein setzt sich zusammen aus dem N-Terminus des *AF4* Proteins mit N-terminaler Homologie Domäne (NHD) und ALF Domäne, sowie dem C-terminalen Bereich des *MLL* Proteins mit den Zinkfinger-Motiven (PHD), der Transaktivator-domäne (TAD) und der SET Domäne. Das *der11* Fusionsprotein enthält den N-terminalen Bereich des *MLL* Proteins mit AT-Haken (AT) und Methyltransferase Homologie Domäne (MT), und den C-terminalen Bereich des *AF4* Proteins mit pSer, NLS und der C-terminalen Homologie Domäne (CHD).

Abbildung 3-5: MEF/tTA Zellen wurden mit den induzierbaren cDNA Konstrukten *pUHD10-3Sfi/AF4*, *pUHD10-3Sfi/AF4•MLL*, *pUHD10-3Sfi/MLL•AF4* und *pUHD10-3/H-ras** transfiziert. Die Bezeichnungen rechts neben den Signalen der 1%igen Agarosegele geben die einzelnen Nachweisreaktionen an. Links der Abbildungen sind die Größen der einzelnen Reaktionen angegeben. In allen dargestellten Reaktionen bedeuten die Spuren M: Größenstandard \square *Cla*I; 1: genomische DNA der verschiedenen MEF/tTA Linien; 2: Wasser-Kontrolle; 3: RNA der Transfektanten +dox; 4: RNA der Transfektanten -dox; 5: cDNA der Transfektanten +dox; 6: cDNA der Transfektanten -dox; 7: Wasser-Kontrolle für RNA/cDNA. Für alle MEF/tTA Linien und PCR-Reaktionen diente *GAPDH* als positiv/negativ Kontrolle. Primerkombinationen der jeweiligen Reaktionen: *GAPDH*: GAPDH•3 x GAPDH•5; *AF4*: AF4-N•3 x AF4-N•5; *der4*: AF4•324b x 12•5; *der11*: 8•3 x AF4•5; *H-ras**(gDNA): pUHD•3 x pUHD•5; *H-ras**(RT-PCR): ras•3 x ras•5.

3.1.3 Charakterisierung der stabil transfizierten MEF/tTA Linien

Alle stabilen Linien wurden zunächst durch genomische PCR auf die Integrität der transfizierten Expressionskonstrukte *pUHD10-3Sfi/AF4*, *pUHD10-3Sfi/AF4•MLL*, *pUHD10-3Sfi/MLL•AF4* und *pUHD10-3/H-ras** überprüft. In Abbildung 3-5 sind die spezifischen Reaktionen für die einzelnen Transfektanten dargestellt. Die PCR-Daten zeigten, dass alle Linien die entsprechenden Expressionsvektoren enthalten.

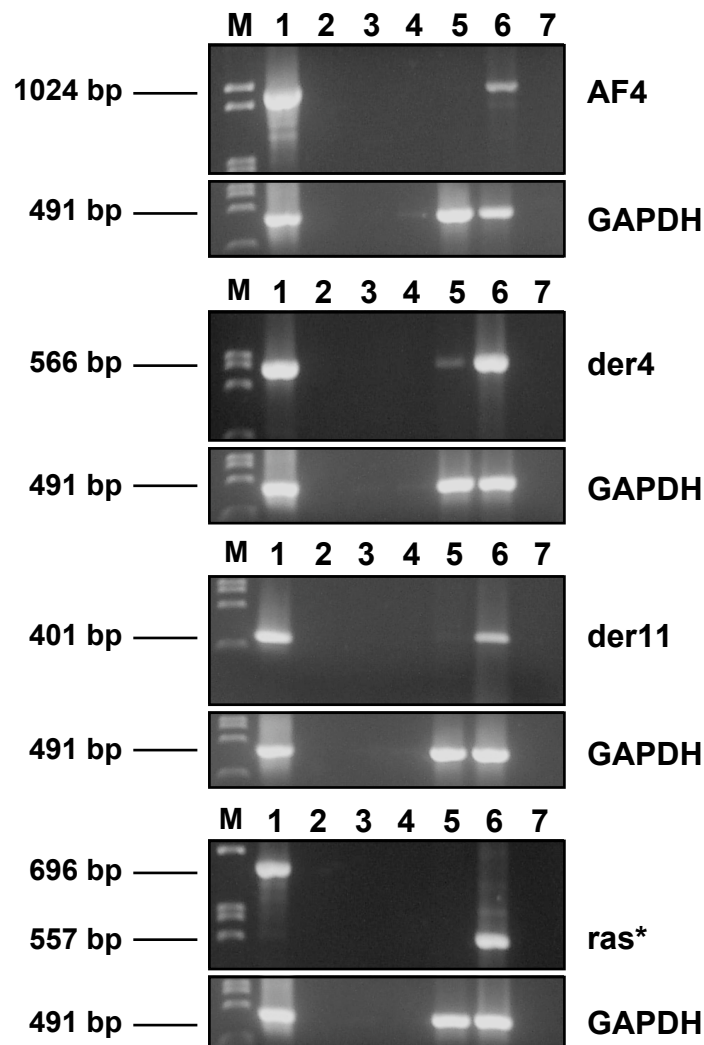


Abbildung 3-5: Charakterisierung der MEF/tTA Linien durch genomische und RT-PCR

Da der Nachweis der Integration allein, keine Aussage über die Induktion und Expression der transfizierten Konstrukte in dem Zellsystem zulässt, wurden RT-PCR Analysen durchgeführt. Um eine Expression der Transgene *AF4*, *AF4•MLL*, *MLL•AF4* und *H-ras** zu induzieren, wurden die entsprechenden Zelllinien ca. eine Woche ohne Zugabe von Doxycyclin kultiviert. Gesamt-RNA wurde jeweils aus induzierten und nicht-induzierten (\pm dox) Ansätzen für jede Zelllinie präpariert. Diese RNA-Präparationen wurden anschließend für cDNA Synthesen eingesetzt. Für jedes Expressionskonstrukt wurden spezifische PCR Analysen, wie in Abbildung 3-5 dargestellt, durchgeführt. Als Kontrolle für die genomische DNA und die cDNA Synthesen wurde eine PCR Reaktion für das Haushaltsgen *GAPDH* durchgeführt. Durch den Einsatz von RNA für die PCR Experimente, konnte eine Verunreinigung der RNA durch genomische DNA ausgeschlossen werden. Die RT-PCR Untersuchungen zeigten zudem, dass die transfizierten Transgene *H-ras**, *AF4* und *MLL•AF4* nur in Abwesenheit von Doxycyclin exprimiert werden. Allein in der *AF4•MLL* transfizierten Linie ist das *tet-off* System leicht durchlässig. In den anschließenden Experimenten wurde trotzdem mit diesem Klon weitergearbeitet, da er unter allen anderen Klonen die beste Kontrolle des *AF4•MLL* Transgens gewährleistete. Die Charakteristika der 4 etablierten, induzierbaren Zelllinien MEF/tTA::AF4, MEF/tTA::der4, MEF/tTA::der11 und MEF/tTA::H-ras* sind in Tabelle 3-1 zusammengefasst.

Ausgangszelllinie	Transaktivator	induzierb. Vektor + Selektionsvektor	Generierte Zelllinie	PCR an gDNA	RT-PCR (+ dox)	RT-PCR (- dox)
MEF/tTA	pTet-Off (tTA)	pUHD10-3Sfi/ <i>AF4</i> + pHMR272-Hyg	MEF/tTA::AF4	+	-	+
MEF/tTA	pTet-Off (tTA)	pUHD10-3Sfi/ <i>AF4•MLL</i> + pHMR272-Hyg	MEF/tTA::der4	+	-/+	+
MEF/tTA	pTet-Off (tTA)	pUHD10-3Sfi/ <i>MLL•AF4</i> + pHMR272-Hyg	MEF/tTA::der11	+	-	+
MEF/tTA	pTet-Off (tTA)	pUHD10-3/ <i>H-ras*</i> + pHMR272-Hyg	MEF/tTA::H-ras*	+	-	+

Tabelle 3-1:

Induzierbare MEF/tTA Zell-Linien und deren Analyse

Alle MEF/tTA Linien weisen in RT-PCR Analysen ein funktionierendes *tet-off* System (\pm dox) auf. tTA: Transaktivator-Protein; dox: Doxycyclin; Hyg: Hygromycin-Resistenz. Nur die MEF/tTA::der4 Zelllinie zeigte bereits eine schwache Expression der cDNA Kassette auch in Anwesenheit von Doxycyclin.

3.1.4 Analyse transfizierter MEF/tTA Linien im *Focus Formation Assay*

Der *Focus Formation Assay* stellt einen Standardassay zur Untersuchung potentieller Onkogene dar, bei dem der Verlust der Kontaktinhibition analysiert wird. Fibroblasten proliferieren in den Kulturschalen nur bis zu einer bestimmten Zelldichte. Bekommen sie Kontakt zu benachbarten Zellen und wird dieser Kontakt immer enger, wird die Proliferation gestoppt (Kontakt-Inhibition). Tragen Fibroblasten onkogene Mutationen, bzw. kodieren sie für Transgene mit transformierender Wirkung, wird bei Erreichen der entsprechenden Zelldichte die Proliferation nicht mehr gestoppt und die Zellen teilen sich weiter. Dadurch entstehen sogenannte Foci auf den Kulturplatten, die durch Anfärben makroskopisch sichtbar werden.

Anhand dieses Assays sollte das transformierende Potential der Transgene *AF4*, *AF4•MLL* und *MLL•AF4* in murinen embryonalen Fibroblasten getestet werden. Dazu wurden die entsprechend stabil transfizierten MEF/tTA Zelllinien in An- und Abwesenheit von Doxycyclin untersucht. Die *H-ras** transfizierte Zelllinie diente als Positivkontrolle und die untransfizierte MEF/tTA Linie wurde als Negativkontrolle mitgeführt.

Abbildung 3-6 zeigt exemplarisch die Ergebnisse mehrerer unabhängig voneinander durchgeführter Experimente, wobei für jede untersuchte Linie ganze Kulturplatten und Ausschnitte in einer 100fachen Vergrößerung dargestellt sind. Wie sehr deutlich zu sehen, führten die Ansätze der Negativ- und Positivkontrollen zu dem erwarteten Ergebnis: untransfizierte MEF/tTA Zellen zeigten keinen sichtbaren Phänotyp, während für MEF/tTA::*H-ras** Zellen Foci-Bildung in Abwesenheit von Doxycyclin makroskopisch sichtbar wurde. Neben *H-ras** exprimierenden Zellen, führte die Expression des Wildtyp *AF4* Proteins und des *AF4•MLL* Fusionsproteins (- dox) ebenfalls zum Verlust der Kontaktinhibition und damit zur Foci-Bildung. Im Gegensatz dazu verhielten sich *MLL•AF4* exprimierende Zellen (- dox) wie nicht-transfizierte MEF/tTA Zellen. *AF4•MLL* transfizierte Zellen bildeten auch in Anwesenheit von Doxycyclin Foci. Dies ist auf die geringe Expression von *AF4•MLL*, wie schon die RT-PCR Analysen zeigten, zurückzuführen (Abbildung 3-5). In den *H-ras** transfizierten Zellen kam es ebenfalls in Anwesenheit von Doxycyclin zu einer geringen Foci-Bildung, obwohl in den RT-PCR Experimenten eine Expression von *H-ras** nicht

nachweisbar war. Dieser Befund zeigt deutlich, dass H-ras* ein sehr potentes Onkoprotein ist.

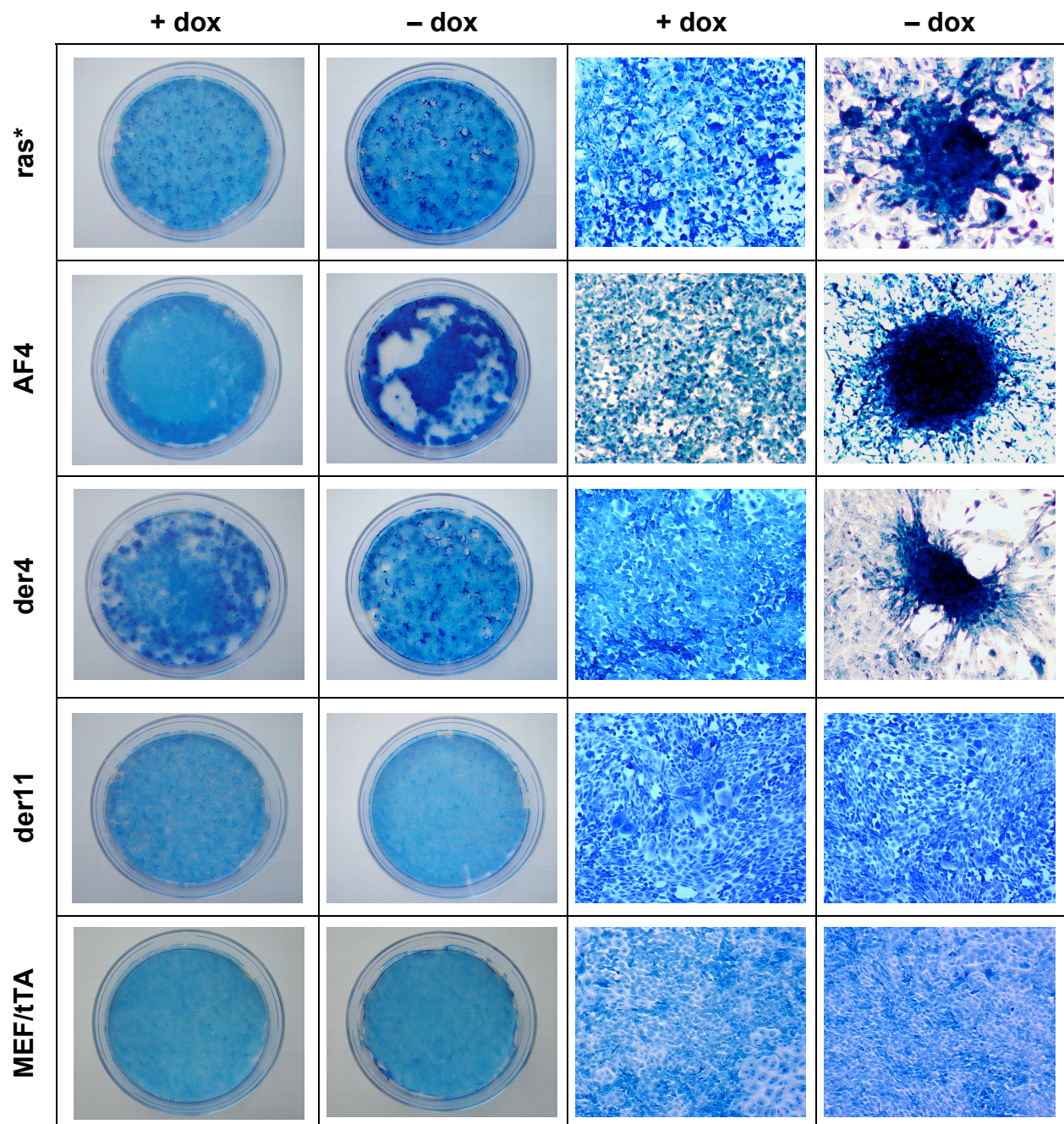


Abbildung 3-6: MEF/tTA Linien im Focus Formation Assay

Die Ansätze mit transfizierten und nicht-transfizierten Zellen (\pm dox) wurden kultiviert und nach 21 Tagen mit Methylenblau-Lösung gefärbt. Die Aufnahmen der Kulturschalen mit der Digitalkamera geben einen repräsentativen Gesamteindruck wieder, während unter dem Lichtmikroskop (Vergrößerung: 100fach) die Morphologie der jeweiligen Zellen und einzelner Foci sichtbar wird. Die Bezeichnungen der untersuchten MEF/tTA Linien sind jeweils den Abbildungen zu entnehmen.

Die Expression von AF4•MLL, AF4 und H-ras* (- dox) führte in diesem Assay auch zu einer morphologischen Veränderung der MEF/tTA Zellen. Während bei der nicht-transfizierten Kontroll-Linie und der *MLL•AF4* transfizierten Linie beobachtet werden konnte, dass sich die Einzelzellen mit zunehmender Zelldichte immer mehr abrundeten und dadurch einen dichten Zellrasen bildeten, zeigten vor allem die *AF4•MLL* transfizierten Zellen einen ganz anderen Phänotyp. Diese Fibroblasten entwickelten eine sehr langgestreckte Zellform und lagerten sich parallel zueinander an, so dass sie eine Art Strang bildeten (Fischgräten-Muster: typisches Kennzeichen von Fibroblasten). Im weiteren Verlauf der Focus-Bildung bekam man den Eindruck, dass die Zellen regelrecht zu dem Zentrum des Focus hingezogen wurden (vgl. auch Abbildung 3-6).

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass schon eine geringe Überexpression des AF4 Proteins zur Transformation muriner embryonaler Fibroblasten ausreicht. Damit sind die Voraussetzungen zur Definition des AF4 Proteins als Proto-Onkoprotein erfüllt. Die Expression des AF4•MLL Fusionsproteins führt ebenfalls zur Foci Bildung in MEF Zellen. Da sich der gemeinsame Bereich zwischen AF4 und AF4•MLL auf den N-Terminus des AF4 Proteins beschränkt (AF4•N; AS 1-346), wurde der Schwerpunkt dieser Arbeit auf die Untersuchung funktioneller Eigenschaften des AF4 N-Terminus verlagert.

3.2 Identifikation der Proteine SIAH1 und SIAH2 als Interaktionspartner von AF4

3.2.1 Analyse des AF4 Proteins in *Yeast Two-Hybrid* Experimenten

Yeast Two-Hybrid Experimente dienen dazu, potentielle Protein-Protein Interaktionen *in vivo* nachzuweisen, sowie Interaktionspartner für die zu untersuchenden Proteine bzw. Proteindomänen zu identifizieren. Das Prinzip des Systems beruht auf der Tatsache, dass eukaryontische Transkriptionsfaktoren separate Domänen besitzen, eine DNA-Bindedomäne (DNA-BD) und eine Transkriptions-aktivierende Domäne (AD). Trennt man beide Domänen voneinander, so verlieren sie dabei nicht ihre spezifischen Eigenschaften. Erneut in räumliche Nähe gebracht sind die beiden Domänen in der Lage sowohl an eine spezifische Kontrollregion (UAS, *upstream activating sequences*) zu binden als auch die Transkription eines nachfolgenden (Reporter-) Gens zu aktivieren (vgl. auch Abbildung 3-7A). Für alle durchgeführten *Yeast Two-Hybrid* Untersuchungen wurde das MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 (Clontech) eingesetzt. Dieses System basiert auf dem modularen Aufbau des Transkriptionsfaktors Gal4, welcher zusammen mit Gal80 die Gene für den Galactose-Metabolismus in Hefe kontrolliert. Der haploide Hefestamm AH109 (Mata) erlaubt eine effiziente Untersuchung von Protein-Interaktionen. Das Wachstum falsch-positiver Hefeklonen wird nahezu ausgeschlossen, da der Hefestamm über drei verschiedene Reportergene (*ADE2*, *HIS3*, und *MEL1/lacZ*) verfügt, die der Transkriptions-Kontrolle durch Gal4 unterliegen. Zudem ist der AH109 Stamm Tryptophan (*TRP1*) und Leucin (*LEU2*) defizient, womit eine Selektion der transfizierten Expressionsvektoren ermöglicht wird. Die zur Verfügung gestellten Fusionsvektoren pGBKT7 und pGADT7 ermöglichen die Expression der Gal4 DNA-BD in Fusion mit dem c-Myc Epitop bzw. der Gal4 AD in Fusion mit dem HA (Hemagglutinin) Epitop. Die beiden Vektoren werden auch als *bait* (pGBKT7)- bzw. *prey* (pGADT7)-Vektor bezeichnet und die Expression der Gal4 Fusionen unterliegt der Kontrolle des ADH (Alkohol-Dehydrogenase) Promotors. In den *bait*-Vektor wird normalerweise die cDNA des zu untersuchenden, rekombinanten Proteins im Leseraster zur Gal4 DNA-BD inkloniert. Der *prey*-Vektor ermöglicht dagegen eine Fusion zwischen der Gal4 AD und potentiellen Bindungspartnern. In Tabelle 3-2 sind die Eigenschaften aller verwendeten Shuttle-Vektoren und Kontrollplasmide

zusammengefasst. Für jedes Transfektions-Experiment wurden die Kontrollplasmide mitgeführt und stellten sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrollen für die Transkriptionsaktivierung und die Detektion des ADE2-, HIS3- und lacZ-Phänotyps dar.

Plasmid	Fusion	Epitop	Auxotrophie- marker	bakterieller Marker
pGBKT7	DNA-BD/ <i>bait</i>	c-Myc	<i>TRP1</i>	kan ^R
pGADT7	<i>AD/prey</i>	HA	<i>LEU2</i>	amp ^R
pACT2	<i>AD/library</i>	HA	<i>LEU2</i>	amp ^R
pGADT7-T	AD/T-Antigen	HA	<i>LEU2</i>	amp ^R
pGBKT7-53	DNA-BD/p53	c-Myc	<i>TRP1</i>	kan ^R
pGBKT7-Lam	DNA-BD/LaminC	c-Myc	<i>TRP1</i>	kan ^R

Tabelle 3-2: Überblick über die verwendeten Klonierungs- und Kontrollplasmide
HA: Hemagglutinin; kan^R: Kanamycin-Resistenz; amp^R: Ampicillin-Resistenz.

Um erste Hinweise zur Biologie des AF4 Proteins zu erhalten, wurde das Protein in einem *Yeast Two-Hybrid Screen* eingesetzt werden. Da allerdings die Expression des gesamten AF4 Proteins in Hefe nicht möglich war, wurde die *AF4* cDNA in drei Fragmente unterteilt. Die einzelnen cDNA Fragmente AF4•N (1-346), AF4•C1 (347-887) und AF4•C2 (888-1212) wurden anhand von PCR Reaktionen generiert, wobei die verwendeten Oligonukleotide über vektorkompatible Restriktionsschnittstellen verfügten. Die Oligonukleotide wurden so konzipiert, dass jeweils der *Forward*-Primer über eine *NdeI*- und der *Reverse*-Primer über eine *SfiI*-Erkennungssequenz verfügte. Nach Restriktionsverdau wurden die einzelnen AF4 cDNA-Fragmente über die *NdeI/SfiI*-Schnittstellen in den Gal4 DNA-BD Vektor pGBKT7 kloniert (Abbildung 3-7B). Nach anschließender Transfektion in den Hefestamm AH109 wurde die Expression der drei Fragmente über Western Blot Analysen mit dem monoklonalen anti-c-Myc Antikörper bestätigt. Da es sich bei dem AF4 Protein sehr wahrscheinlich um einen Transkriptionsfaktor handelt, musste vor dem eigentlichen *Yeast Two-Hybrid Screen* eine autonome Transaktivierung der Reportergene durch die Fusionsproteine Gal4BD::AF4•N, Gal4BD::AF4•C1 und Gal4BD::AF4•C2

ausgeschlossen werden. Keines der drei fusionierten AF4 Fragmente führte zu einer transkriptionellen Aktivierung der Reporter gene im Hefestamm AH109.

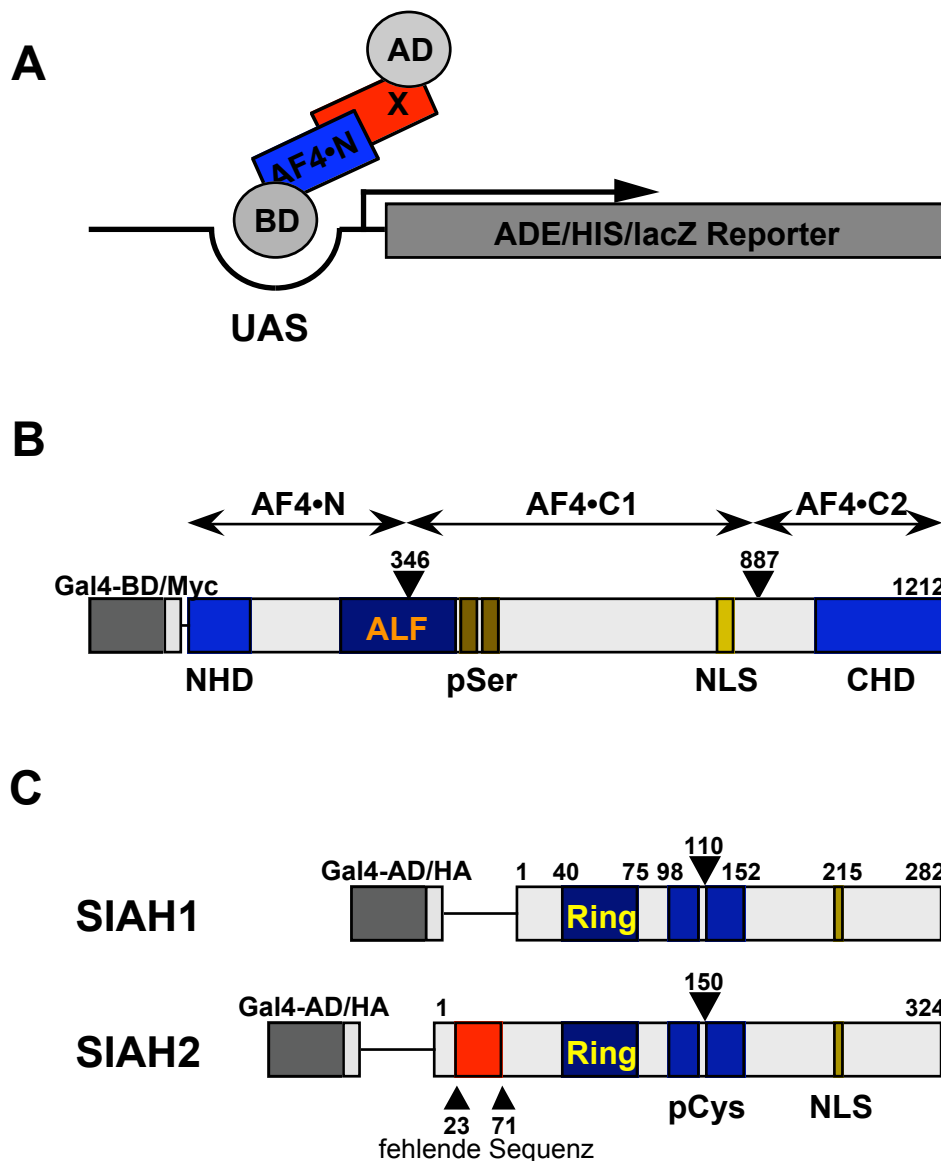


Abbildung 3-7: Zusammenfassung der Yeast Two-Hybrid Screens mit Teildomänen des AF4 Proteins

A. Prinzip des Yeast Two-Hybrid Screens mit der Rekonstituierung des Gal4 Transkriptionsfaktors bei einer Interaktion von AF4•N mit einem unbekanntem Interaktionspartner (X). BD: Gal4 DNA-BD; AD: Gal4 AD; UAS: *upstream activating sequences*. **B.** Schematische Darstellung des AF4 Proteins. Doppel-Pfeile repräsentieren die AF4 Fragmente in Fusion mit der Gal4 DNA-BD. Gal4-BD/Myc: c-Myc Epitop fusioniert an die Gal4 DNA-BD. **C.** Schematische Darstellung der identifizierten Interaktionspartner SIAH1 und SIAH2. Beide SIAH Proteine verfügen über eine RING Finger Domäne im N-Terminus, über eine Cystidin-reiche Region (pCys) und eine nukleäre Lokalisations-Sequenz (NLS) im C-Terminus. Die C-Termini (SIAH1: 110-283, SIAH2: 150-324) kodieren die Substrat-Binde Domänen (SBD). Gal4-AD/HA: HA (Hemagglutinin) Epitop fusioniert mit der Gal4 AD.

Nach Abschluss dieser Vorversuche konnten die etablierten Hefe-Klone (AH109/Gal4BD::AF4•N, AH109/Gal4BD::AF4•C1, AH109/Gal4BD::AF4•C2) für den *Yeast Two-Hybrid Screen* eingesetzt werden. Dazu wurden diese Hefe-Klone (Mata) jeweils mit einer käuflich erworbenen, bereits in den Hefestamm Y187 (Mat \square) transfizierten humanen Knochenmark cDNA-Bank diploidisiert. Die cDNA Sequenzen der Knochenmark-Bibliothek waren dazu in den Gal4 AD Vektor pATC2 kloniert. Für die Fusionsproteine Gal4BD::AF4•C1 und Gal4BD::AF4•C2 konnten in mehreren unabhängigen *Screens* keine diploiden Hefe-Klone auf den entsprechenden Selektionsplatten (SD -ADE, -HIS, -LEU, -TRP) erhalten werden. Das *Screening* Experiment mit dem Gal4BD::AF4•N Fusionsprotein ergab allerdings bereits im ersten Durchgang über 500 positive Hefe-Klone. Zur Identifikation der gefundenen Interaktionspartner wurden 100 individuelle Hefe-Klone untersucht. Dazu wurden die Gal4 DNA-BD und Gal4 AD Plasmide aus den Hefe-Klonen isoliert und in *E.coli* transformiert. Da die beiden Plasmide in Bakterien unterschiedliche Antibiotika-Resistenzen vermitteln, konnten sie somit getrennt und anschliessend sequenziert werden.

Gal4 fusionierte cDNA Sequenz	Anzahl der Klone	SD -Ade, -His, -Leu,-Trp \square -Galaktosidase Aktivität
SIAH1	21	+
SIAH2	31	+
TLS/FUS	3	-
PCDNA	2	n.u.
Titin	6	n.u.
unbekannte Gene	16	n.u.
artifizuell fusionierte ORFs	21	n.u.

Tabelle 3-3: Isolierte cDNA Sequenzen aus dem *Yeast Two-Hybrid Screen* mit dem AF4•N Protein als *bait*
 +: Wachstum auf SD -Ade,-His,-Leu,-Trp und positiver \square -Galaktosidase Test; -: kein Wachstum auf SD -Ade,-His,-Leu,-Trp und negativer \square -Galaktosidase Test; n.u.: nicht untersucht.

In 21 Fällen war an die Gal4 AD die komplette Kodiersequenz des humanen *SIAH1* Gens fusioniert. Die gefischten cDNAs für SIAH1 waren im richtigen Leseraster zur

Gal4 AD, beinhalteten allerdings unterschiedlich lange 5'-NTR Bereiche (Abbildung 3-7C). 31 der isolierten cDNAs beinhalteten den offenen Leserahmen des humanen *SIAH2* Gens, wobei alle Klone im N-terminalen Kodierbereich eine Deletion von 49 Aminosäuren (□23-71) aufwiesen. Ansonsten beinhalteten die *SIAH2* cDNAs ebenfalls 5'-NTR Sequenzen (Abbildung 3-7C). Alle anderen untersuchten Klone wiesen Gal4 AD Fusionen mit artifiziellen Sequenzen (z.B. 3'-NTR) auf, oder die cDNA Sequenzen wurden jeweils nur vereinzelt isoliert. Die Interaktion des AF4•N Proteins mit einem dieser Klone (TLS/FUS) wurde experimentell überprüft und stellte sich als falsch-positiv heraus (Tabelle 3-3).

3.2.2 Verifizierung der Interaktion zwischen dem AF4•N Protein und den SIAH1 und SIAH2 Proteinen in Hefe

Obwohl die 5' nicht-translatierte Region der gefundenen *SIAH1* und *SIAH2* cDNAs keine Stop-Kodons enthielten, sollte sichergestellt werden, dass die Interaktion des AF4•N Proteins mit den kodierenden Bereichen beider *SIAH* Gene vermittelt wurde. Dazu wurden die Leserahmen der *SIAH1* und *SIAH2* cDNA-Sequenzen amplifiziert und gleichzeitig mit *NdeI/SfiI*-Schnittstellen versehen. Nach entsprechendem Restriktionsverdau wurden die beiden cDNA-Konstrukte mit der Gal4 AD (pGADT7) fusioniert und jeweils zusammen mit dem Gal4-BD/AF4•N Konstrukt in den Hefestamm AH109 transfiziert. Für die erhaltenen Hefe-Klone konnten alle Fusionsproteine in Western Blot Experimenten mit den Antikörpern anti-c-Myc und anti-HA nachgewiesen werden (Abbildung 3-8). Anschließend wurde sowohl das Wachstum auf geeigneten Selektionsplatten (SD -ADE, -HIS, -LEU, -TRP) und damit die Transaktivierung der Reportergene *ADE2* und *HIS3* (Abbildung 3-8B) als auch die □-Galaktosidase Aktivität (*lacZ* Reportergen; Abbildung 3-8C) der transfizierten Hefe-Klone untersucht. Um die Interaktion zwischen AF4•N und *SIAH1* bzw. *SIAH2* unabhängig von der fusionierten Gal4 Domäne zu überprüfen, wurde die AF4•N cDNA mit der Gal4 AD und umgekehrt die *SIAH1* und *SIAH2* cDNAs mit der Gal4 DNA-BD fusioniert. Ein positiver □-Galaktosidase Test bestätigte auch in diesem Transfektionsexperiment die spezifische Interaktion zwischen dem AF4•N Protein und den beiden *SIAH* Proteinen (Abbildung 3-8C).

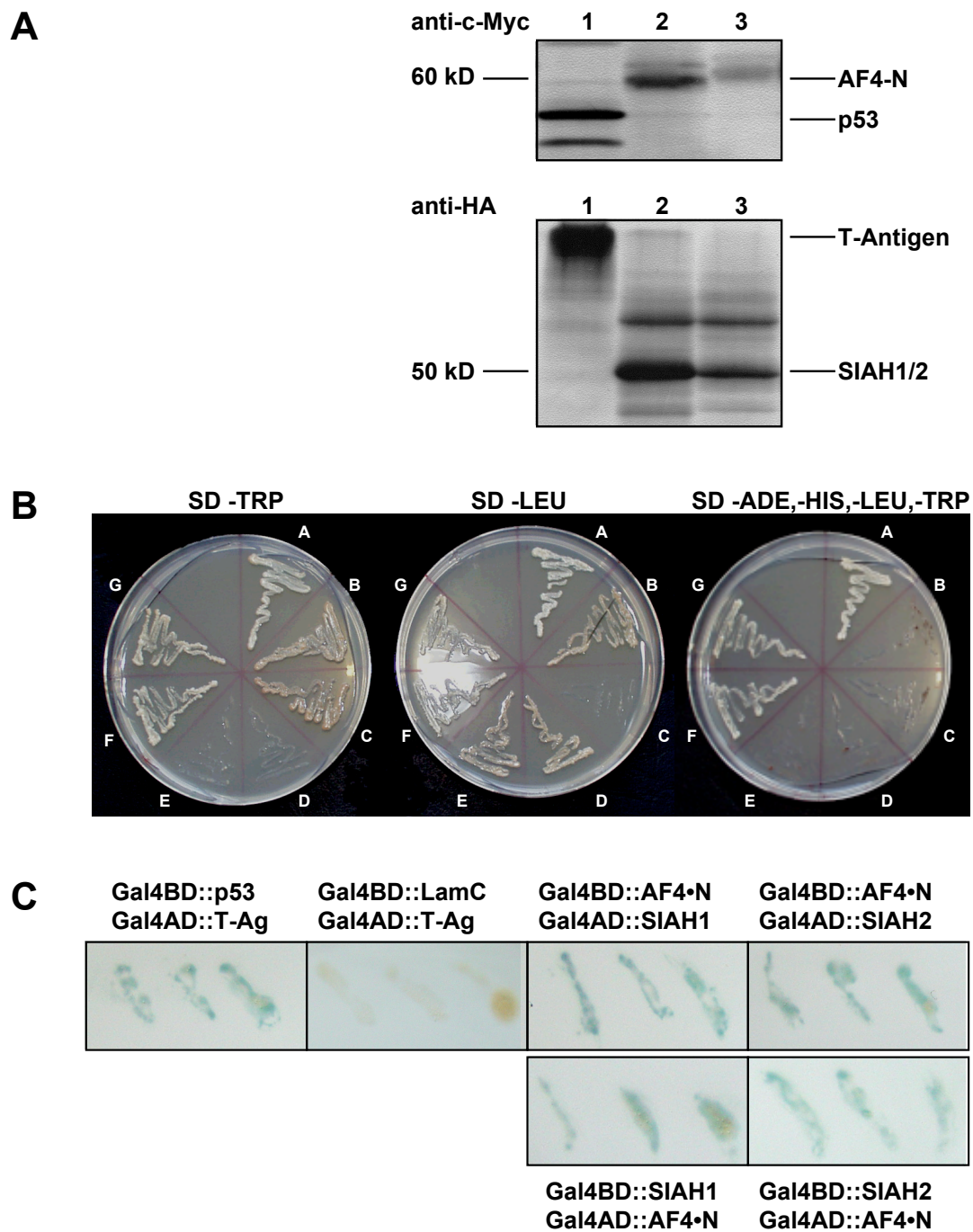


Abbildung 3-8: Protein-Interaktions Studien zwischen AF4•N und SIAH1 bzw. SIAH2 in Hefe

A. Western Blot Analysen transfizierter Hefe-Klone. Gal4 DNA-BD Fusionsproteine wurden mit dem Antikörper anti-c-Myc und Gal4 AD Fusionsproteine mit dem Antikörper anti-HA detektiert. Untersucht wurde jeweils Gesamtextrakt aus Hefe-Klonen, transfiziert mit (1) Gal4-BD/p53, Gal4-AD/T-Antigen; (2) Gal4-BD/AF4•N, Gal4-AD/SIAH1 und (3) Gal4-BD/AF4•N; Gal4-AD/SIAH2. **B.** Untersuchung des Wachstums auf verschiedenen Selektionsplatten. A: Gal4-BD::p53 und Gal4-AD::T-Antigen; B: Gal4-BD::LaminC und Gal4-AD::T-Antigen; C: Gal4-BD::AF4•N; D: Gal4-AD::SIAH1; E: Gal4-AD::SIAH2; F: Gal4-BD::AF4•N und Gal4-AD::SIAH1; G: Gal4-BD::AF4•N und Gal4-AD::SIAH2. **C.** Untersuchung der β -Galaktosidase Aktivität der wie in der Abbildung gekennzeichneten, transfizierten Hefe-Klone. Blau: β -Galaktosidase aktiv; Weiss: β -Galaktosidase nicht aktiv.

3.3 Interaktion des AF4•N Proteins mit den SIAH1 und SIAH2 Proteinen *in vitro*

Die Interaktion zwischen dem AF4•N Protein und dem SIAH1 bzw. SIAH2 Protein sollte in einem Hefe unabhängigen System bestätigt werden. Deshalb wurden zum einen FAR Western Blot Analysen und zum anderen GST (Glutathion-S-Transferase) *Pulldown* Experimente mit rekombinant hergestellten Proteinen durchgeführt. Die rekombinanten Proteine AF4•N, SIAH1 und SIAH2 wurden für beide Experimente entweder in *E.coli* als GST-Fusionsproteine exprimiert und anschließend aufgereinigt oder, unter Verwendung von [³⁵S]-Methionin, *in vitro* transkribiert und translatiert. Zur Herstellung der GST-Fusionskonstrukte wurden die cDNAs für AF4•N, SIAH1 und SIAH2 in den IPTG-induzierbaren, bakteriellen Expressionsvektor pGEX5T kloniert. Dazu wurden die entsprechenden cDNAs mittels PCR amplifiziert und gleichzeitig mit Vektor-kompatiblen Restriktionsschnittstellen versehen. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass eine Klonierung der AF4•N und SIAH2 Konstrukte im richtigen Leseraster über die *BamHI* und *EcoRI* Schnittstellen ermöglicht wurde. Da sich innerhalb der SIAH1 cDNA eine *BamHI* Schnittstelle befindet, wurde dieses Konstrukt so konzipiert, dass eine Klonierung über *HindIII* und *EcoRI* möglich war. Für die *in vitro* Transkription und Translation wurden die SIAH1 und SIAH2 Konstrukte in dem Vektor pGBKT7 verwendet, da dieser Vektor über einen T7 Promotor verfügt und eine Expression in Reticulozyten-Lysat ermöglicht.

Die FAR Western Blot Technik erlaubt die Darstellung einer Interaktion zwischen zwei Proteinen, ähnlich der Bindung eines Antikörpers an sein Epitop. Dementsprechend wurden die aufgereinigten GST-Fusionsproteine für AF4•N, SIAH1 und SIAH2, wie in Abbildung 3-9, dargestellt auf ein SDS-Gel aufgetragen, auf eine Membran übertragen und *in situ* renaturiert. Um eine Interaktion mit dem GST-Anteil der Fusionsproteine auszuschließen, wurde ebenfalls rekombinantes GST Protein aufgetragen. Als weitere Negativkontrolle wurden auch nicht-induzierte Bakterien (-IPTG) für den Assay eingesetzt. Anschließend wurde die Membran mit den potentiellen, radioaktiv markierten Interaktionspartnern SIAH1 und SIAH2 inkubiert. Nach Exposition eines Röntgenfilms auf den entsprechend behandelten Membranen konnte eine starke und spezifische Interaktion der beiden SIAH Proteine mit dem GST::AF4•N Fusionsprotein festgestellt werden (Abbildung 3-9; Spuren 8).

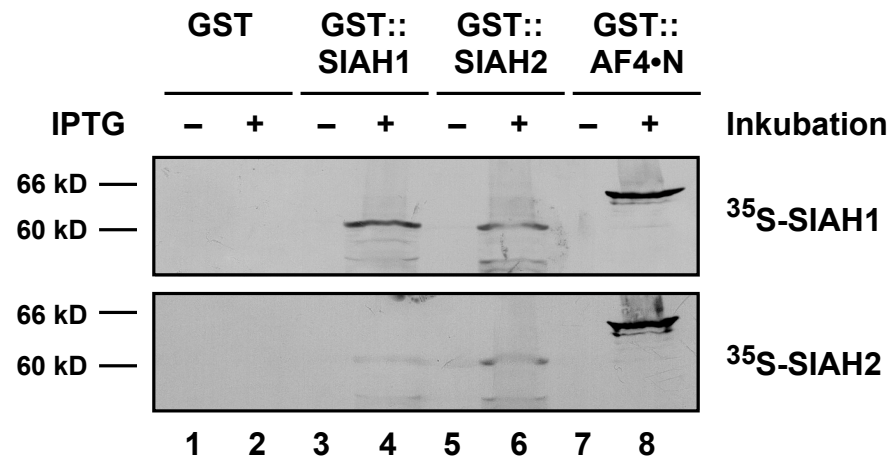


Abbildung 3-9: Zusammenfassung der FAR Western Blot Analysen

Zur Aufreinigung von rekombinantem GST Protein (Spuren 1 und 2) und der GST-Fusionsproteine GST::*SIAH1* (Spuren 3 und 4), GST::*SIAH2* (Spuren 5 und 6) und GST::*AF4•N* (Spuren 7 und 8) wurde Zell-Lysat nicht-induzierter und induzierter Bakterienkulturen verwendet (\pm IPTG). Die aufgereinigten GST-Fusionsproteine wurden wie dargestellt auf eine Nitrocellulose-Membran transferriert und entweder mit radioaktiv markiertem *SIAH1* (^{35}S -*SIAH1*) oder *SIAH2* (^{35}S -*SIAH2*) inkubiert. Das genaue Molekulargewicht beträgt für GST::*AF4•N* 66,61 kD, für GST::*SIAH1* 59,4 kD und für GST::*SIAH2* 59,0 kD.

In der Literatur war für das *SIAH1* Protein bereits eine Homodimerisierung über seine carboxy-terminale Substrat-Binde Domäne beschrieben (Lorick, 1999), weshalb die Interaktion des radioaktiv markierten *SIAH1* Proteins mit dem GST::*SIAH1* Fusionsprotein als Positivkontrolle für den Assay eingesetzt wurde (Abbildung 3-9; Spur 4, oberes Bild). Darüber hinaus, konnte mit diesen Experimenten zusätzlich eine Homodimerisierung des *SIAH2* Proteins (Abbildung 3-9; Spur 6, unteres Bild) und eine Heterodimerisierung der *SIAH1* und *SIAH2* Proteine (Abbildung 3-9; Spur 4, unten und Spur 6, oben) gezeigt werden.

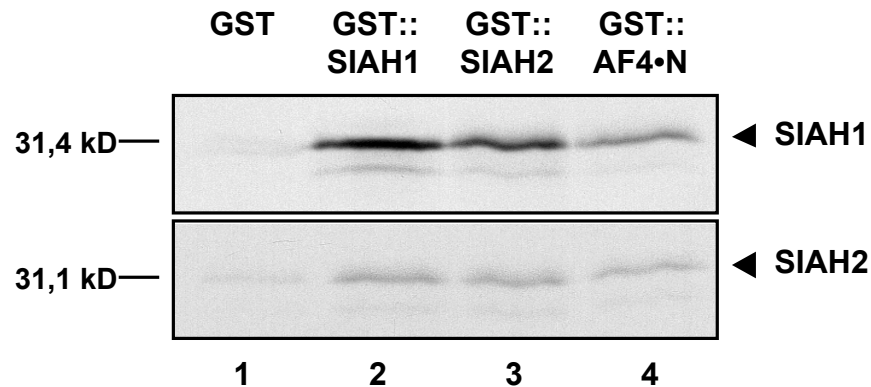


Abbildung 3-10: GST Pull-down Experimente

Gleiche Proteinmengen an aufgereinigtem GST (Spur 1), GST::SIAH1 (Spur 2), GST::SIAH2 (Spur 3) und GST::AF4•N (Spur 4) wurden in Lösung mit ^{35}S -markiertem SIAH1 bzw. SIAH2 inkubiert. Die präzipitierten, radioaktiven Proteine sind dargestellt. Das Molekulargewicht von SIAH1 beträgt 31,4 kD und das von SIAH2 beträgt 31,1 kD.

Um die Bindung des SIAH1 bzw. SIAH2 Proteins an das AF4•N Protein auch in Lösung zu untersuchen, wurden zusätzlich GST *Pull-down* Experimente durchgeführt. Dazu wurden die aufgereinigten GST-Fusionsproteine GST::AF4•N, GST::SIAH1 und GST::SIAH2 mit dem jeweils ^{35}S -markierten, *in vitro* translatierten SIAH1 oder SIAH2 Protein inkubiert und anschließend präzipitiert (*pull-down assay*). Die erhaltenen Präzipitate wurden über SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und radiologisch untersucht. Wie die Ergebnisse der Interaktionstests in Hefe und der FAR Western Analysen bereits vermuten ließen, präzipitiert das GST::AF4•N Fusionsprotein sowohl das SIAH1 als auch das SIAH2 Protein (Abbildung 3-10; Spuren 4). Die Homo- und Heterodimerisierung der beiden SIAH Proteine konnte nochmals bestätigt werden (Abbildung 3-10; Spuren 2 und 3) und eine Interaktion mit dem GST-Anteil der Fusionsproteine konnte auch in diesem Experiment ausgeschlossen werden (Abbildung 3-10; Spur 1).

3.4 Interaktion des AF4•N Proteins mit dem SIAH1 Protein *in vivo*

Als nächstes sollte überprüft werden, ob das AF4•N Protein auch in einer natürlichen Umgebung, nämlich *in vivo* und in Säugerzellen mit dem SIAH1 Protein interagiert. Da die beiden humanen SIAH Proteine eine sehr hohe Homologie aufweisen und in ihrem C-Terminus nahezu identisch sind (Hu, 1997a; Hu und Fearon, 1999) (siehe auch Abbildung 3-7), wurde für alle folgenden Experimente zumeist nur das SIAH1 Protein herangezogen. Um nun eine Interaktion zwischen AF4•N und SIAH1 *in vivo* darzustellen, sollten Co-Immunopräzipitationsversuche in humanen 293T Fibroblasten durchgeführt werden. Zu diesem Zweck musste zunächst die Transfektions-Effizienz für die 293T Zellen bestimmt werden und der offene Leserahmen für AF4•N und SIAH1 in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert werden.

Zur Bestimmung der Transfektions-Effizienz wurden die 293T Zellen ausgebracht und mit steigenden Konzentrationen (1 µg, 5 µg, 10 µg und 20 µg) eines GFP (*green fluorescent protein*) exprimierenden Vektor (pEGFP) transfiziert. Die Auswertung mehrerer unabhängiger Ansätze ergab eine maximale Transfektions-Effizienz von ca. 80%, wenn 10 µg Plasmid-DNA transfiziert wurden (Abbildung 3-11).

Um eine höchstmögliche Expression des AF4•N und SIAH1 Proteins zu gewährleisten, wurden die entsprechenden cDNAs in den für Säugerzellen optimierten Vektor pTARGET kloniert. Dieser Vektor erlaubt eine starke, konstitutive Expression, da er mit der CMV *immediate-early* Enhancer/Promotor Region und einem chimären Intron vor der *mcs* ausgestattet ist. Zudem verfügt der Vektor über 3'-Thymidin Überhänge innerhalb der *mcs*, so dass die cDNAs für AF4•N und SIAH1, nach Amplifikation, durch einfache Ligation in den Vektor kloniert werden konnten.

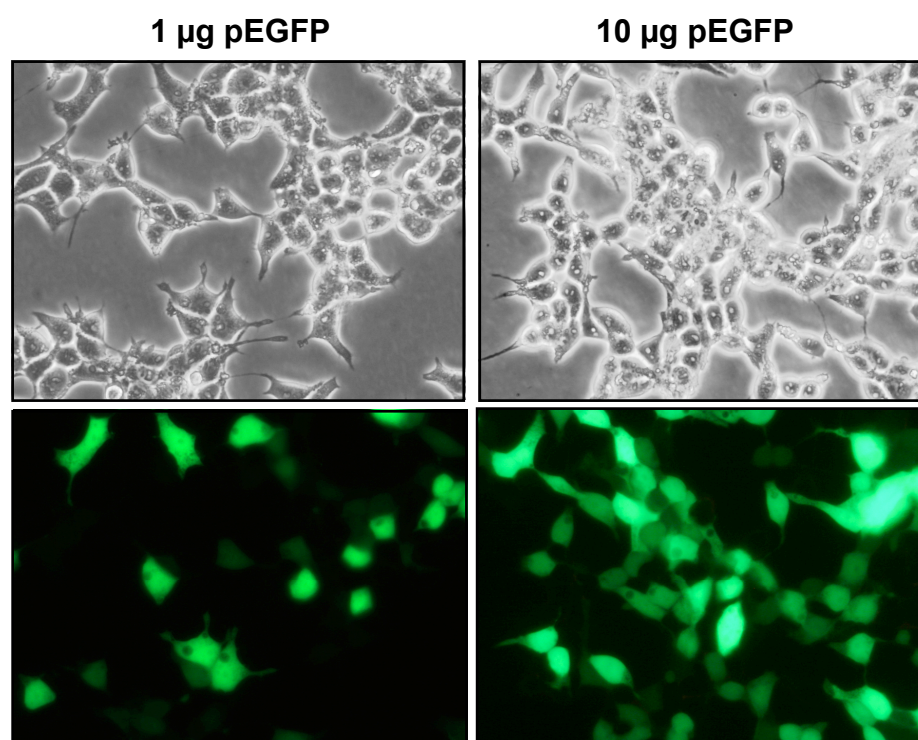
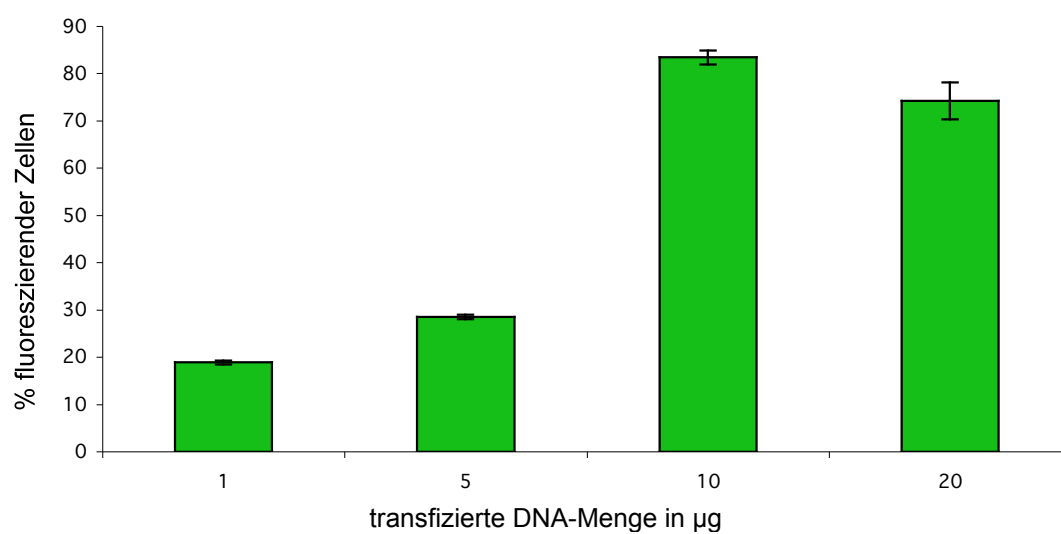


Abbildung 3-11: Bestimmung der Transfektions-Effizienz von 293T Fibroblasten
Transfiziert wurden anhand der CaPO₄-Methode je 1 µg, 5 µg, 10 µg und 20 µg pEGFP Vektor-DNA.

3.5 Regulation der AF4•N Proteininstabilität durch SIAH1

Die beiden Proteine SIAH1 und SIAH2 stellen die humanen Homologe des aus *Drosophila melanogaster* bekannten Proteins *seven in absentia* (Sina) dar (Hu, 1997a). DrSina und hSIAH1/2 zeichnen sich durch eine für E3 Ubiquitin Ligasen typische RING-Finger Domäne im N-terminalen Bereich und eine Substrat-Binde Domäne (SBD) im C-terminalen Bereich aus (vgl. 2.5.1 und 2.5.2). Die RING-Finger Domäne innerhalb des N-Terminus ermöglicht eine Interaktion mit E2 Ubiquitin Enzymen, welche den Ubiquitin Transfer auf SBD-gebundene Proteine katalysieren und dadurch ihren Abbau über den Proteasom-Komplex einleiten (Lorick, 1999). In einer aktuelleren Studie konnte der molekulare Mechanismus dargestellt werden, welcher für die Bindung der unterschiedlichen Substratproteine an die SBD der SIAH1 Ubiquitin Ligase verantwortlich ist (House, 2003). So konnte sowohl für die Interaktion des *Drosophila* Proteins Sina mit dem Phyllopod Protein als auch für die Interaktion des SIAH1 Proteins mit den bekannten Substraten DCC, OBF-1, SIP und TIEG1 ein funktionell konserviertes Binde-Motiv für die SBD identifiziert werden. Für einige andere SIAH1-interagierende Proteine wie Numb, Vav-1, Kid und N-CoR wurden degenerierte Varianten der identifizierten Kernsequenz PxAxVxP gefunden.

Die Interaktion des AF4•N Proteins mit dem SIAH1 Protein konnte in den vorangegangenen Experimenten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* belegt werden, weshalb eine SIAH1-vermittelte Proteindegradation des AF4 Proteins als konsequent erschien. Eine Sequenzanalyse des N-Terminus von AF4 zeigte zudem, dass die hoch konservierte ALF Domäne über ein SIAH1 Binde-Motiv (PxAxVxP) verfügt (Abbildung 3-13). Eine Bindung des SIAH1 Proteins an das Binde-Motiv innerhalb des AF4 Proteins und auch der anderen ALF Proteine hätte demnach deren proteasomalen Abbau zur Folge.

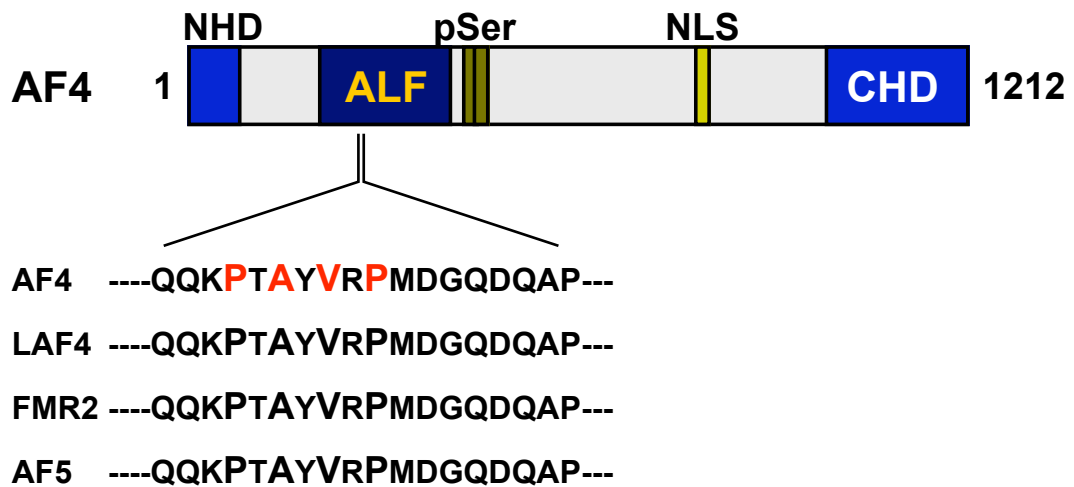


Abbildung 3-13: SIAH1 Binde-Motiv PxAxVxP innerhalb der hochkonservierten ALF Domäne des AF4 Proteins
 Repräsentativ für die ALF Familienmitglieder ist das Binde-Motiv innerhalb der AF4 Proteinsequenz rot dargestellt.

Um auch experimentell zu zeigen, dass eine Interaktion des AF4 Proteins mit der E3 Ubiquitin Ligase SIAH1 letztlich zum Abbau über den Proteasom-Komplex führt, wurden verschiedene Studien in transient transfizierten 293T Fibroblasten durchgeführt. Dazu wurde entweder AF4•N (pTARGET/AF4•N) allein oder AF4•N in Kombination mit SIAH1 (pTARGET/SIAH1) in 293T Zellen überexprimiert. Anschließend wurden die Transfektions-Ansätze geteilt und es wurde jeweils die RNA- als auch die Proteinmenge von AF4•N und SIAH1 untersucht.

Zur Untersuchung der RNA-Konzentration in den transfizierten 293T Zellen wurden semi-quantitative RT-PCR Untersuchungen durchgeführt, wobei auch untransfizierte Zellen untersucht wurden. Um Kontaminationen der RNA mit genomischer DNA auszuschließen, wurde auch die isolierte RNA ohne cDNA Synthese für PCR-Reaktionen eingesetzt. Da die beiden Proteine AF4•N und SIAH1 in einfachen Western Blot Untersuchungen mit Gesamtzell-Lysat nur schwer nachweisbar waren, was bereits für einen schnellen Abbau sprach, wurden die beiden Proteine jeweils mit dem gleichen Antikörper immunopräzipitiert und im Western Blot untersucht. Untransfizierte 293T Zellen wurden für die Bestimmung der Proteinmenge als Negativkontrolle eingesetzt.

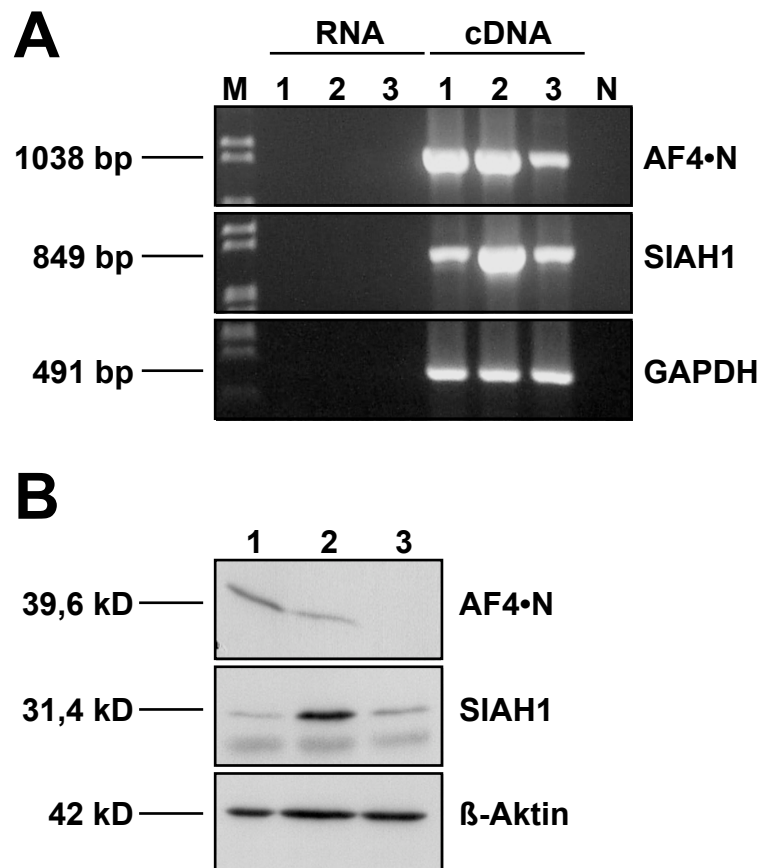


Abbildung 3-14: SIAH1-vermittelte AF4•N Proteindegradation

Untersucht wurden die *steady-state* mRNA- (A) und Proteinmengen (B) des AF4•N (jeweils oberes Bild) und SIAH1 (jeweils mittleres Bild) Proteins in AF4•N transfizierten (Spuren 1), AF4•N und SIAH1 co-transfizierten (Spuren 2) und nicht-transfizierten 293T Zellen. **A.** RT-PCR Experimente. M: Größenstandard \square *Clal*; N: Wasser-Kontrolle. Die Untersuchung von *GAPDH* diente als positiv-Kontrolle für die cDNA Synthesen. Primerkombinationen der jeweiligen Reaktionen: *AF4•N*: AF4•N•3 x AF4•N•5; *SIAH1*: SIAH1(ATG)•3 x SIAH(ATG)•5; *GAPDH*: GAPDH•3 x GAPDH•5. **B.** Immunopräzipitations Experimente. Die Proteine AF4•N und SIAH1 wurden jeweils mit dem Antikörper anti-AF4•N bzw. anti-SIAH1 präzipitiert und auch detektiert. Als Lade-Kontrolle wurde \square -Aktin in dem eingesetzten Gesamtzell-Lysat nachgewiesen.

Die Untersuchung der AF4•N Proteinmenge im Immunoblot (Abbildung 3-14B) ergab eine Reduktion des AF4•N Proteins, wenn zusätzlich SIAH1 Protein überexprimiert wurde (Abbildung 3-14B, Spur 2). Dagegen wurden, sowohl für AF4•N transfizierte als auch für AF4•N und SIAH1 co-transfizierte Zellen, in den RT-PCR Untersuchungen gleiche mRNA-Mengen für AF4•N nachgewiesen (Abbildung 3-14A, Spuren 1 und 2). Für das SIAH1 Protein wurde erwartungsgemäß in den entsprechend transfizierten Zellen eine Zunahme der RNA- und Proteinmenge

festgestellt (Abbildung 3-14A und B, Spuren 2), womit eine SIAH1-abhängige Reduktion der AF4•N Protein-Konzentration gezeigt werden konnte.

Um der Fragestellung nachzugehen, ob die durch SIAH1-vermittelte AF4•N Protein-degradation auch tatsächlich über den Proteasom-Komplex passiert, wurde für Transfektions Experimente in 293T Zellen der Proteasom-Inhibitor MG132 verwendet. Dazu wurden gleiche Mengen des AF4•N Expressionskonstrukts (10 µg) mit steigenden Mengen des SIAH1 Expressionsvektors (5 - 15 µg) co-transfiziert. Die transient transfizierten 293T Zellen wurden 12 Stunden vor der Lyse mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt. In anschließenden Western Blot Analysen mit den monoklonalen Antikörpern anti-SIAH1 und anti AF4•N wurden auch co-transfizierte, allerdings MG132 unbehandelte 293T Zellen mitgeführt (Abbildung 3-15).

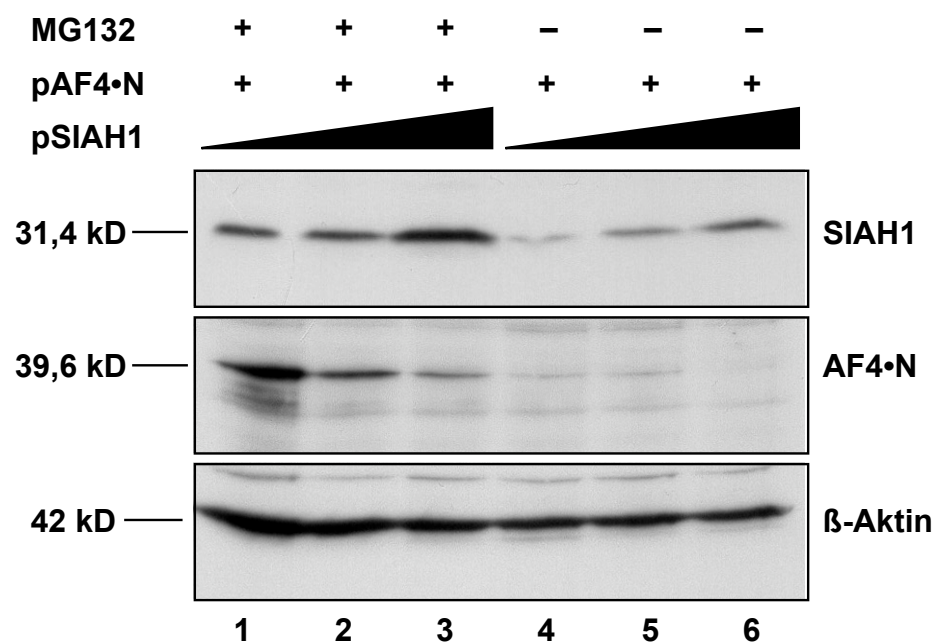


Abbildung3-15: Darstellung des SIAH1-vermittelten AF4•N Proteinabbaus über den Proteasom-Komplex

Aufgetragen wurde Gesamtzell-Lysat von 293T Fibroblasten, die mit konstanten Mengen des Expressionskonstruktes für AF4•N und steigenden Mengen des Expressionskonstruktes für SIAH1 co-transfiziert wurden. Spuren 1 und 4: 10 µg pTARGET/AF4•N und 5 µg pTARGET/SIAH1;Spuren 2 und 5: 10 µg pTARGET /AF4•N und 10 µg pTARGET/SIAH1;Spuren 3 und 6: 10 µg pTARGET/AF4•N und 15 µg pTARGET/SIAH1. Die transient transfizierten Zellen wurden entweder mit 10 µM MG132 inkubiert (Spuren 1-3) oder direkt (Spuren 4-6) lysiert und analysiert. Untersucht wurden die Proteinmengen von SIAH1 und AF4•N im Western Blot mit den monoklonalen Antikörpern anti-SIAH1 und anti-AF4•N. Der Nachweis des β-Aktin Proteins diente als Lade-Kontrolle.

Wie in Abbildung 3-15 dargestellt, führte die steigende Expression von SIAH1 Protein zu einer entsprechenden Abnahme des AF4•N Proteins. Die festgestellten Proteinmengen von SIAH1 und AF4•N waren allerdings nicht nur invers korreliert, sondern durch die Inkubation mit dem Proteasom-Inhibitor ließ sich zudem die SIAH1-vermittelte Degradation von AF4•N um ein vielfaches verhindern (Abbildung 3-15, Spuren 1-3). Im Gegensatz dazu konnte in Abwesenheit von MG132 kaum AF4•N Protein nachgewiesen werden (Abbildung 3-15, Spuren 4-6; mittleres Bild). Auch SIAH1 Protein bildet Homodimere und wird ohne Bindung an Targetproteine autokatalytisch dem Abbau über das Proteasom zugeführt. Dies war in den MG132-unbehandelten Ansätzen nicht festzustellen (Abbildung 3-15, Spuren 4-6; oberes Bild).

3.6 Regulation der AF4 und AF4•MLL Proteinstabilität

Die bislang dargestellten Experimente zeigen, dass das AF4•N Protein nicht nur spezifisch von der E3 Ubiquitin Ligase SIAH1 gebunden wird, sondern, dass die Interaktion dieser beiden Proteine zu einer Ubiquitin-Markierung und damit zu einem Proteasom-abhängigen Abbau des AF4•N Proteins führt. Ähnliches war auch für das AF4 Wildtyp-Protein anzunehmen. Das aus einer t(4;11) Translokation resultierende, chimäre Fusionsprotein AF4•MLL beinhaltet ebenfalls den N-terminalen Bereich des AF4 Proteins und damit auch das SIAH1 Binde-Motiv. Damit stellte sich die, möglicherweise auch für die Leukämogenese, sehr interessante Frage, ob das SIAH1 Protein in der Lage wäre das AF4•MLL Fusionsprotein zu binden und dessen Abbau über das Proteasom zu vermitteln. Aufgrund dieser Überlegungen sollten die *Sfi*-mobilisierbaren cDNA Konstrukte für AF4 und AF4•MLL in den Expressionsvektor pTARGET kloniert und anschließend in Transfektionsstudien untersucht werden.

3.6.1 Modifikation des pTARGET Expressionsvektors

Die Klonierung der *Sfi*I mobilisierbaren AF4 und AF4•MLL cDNA Konstrukte erforderte einige Änderungen innerhalb des Expressionsvektors. Der Vektor pTARGET stellte innerhalb der *mcs* keine *Sfi*I Schnittstelle zur Verfügung, wies allerdings im Vektor-*backbone* eine *Sfi*I Erkennungssequenz auf. Aus diesem Grund musste zunächst die *Sfi*I Erkennungssequenz innerhalb des Vektors zerstört werden. Dazu wurde der zirkularisierte Vektor pTARGET mit der Restriktionsendonuklease *Sfi*I verdaut und die entstandenen 3'-Überhänge wurden durch eine spezielle Klenow-Reaktion eliminiert. Anschließende Ligation der glatten Vektorenden führte zum Verlust von drei Nukleotiden und damit zu einer nicht mehr funktionsfähigen *Sfi*I Schnittstelle (pTARGET \emptyset Sfi).

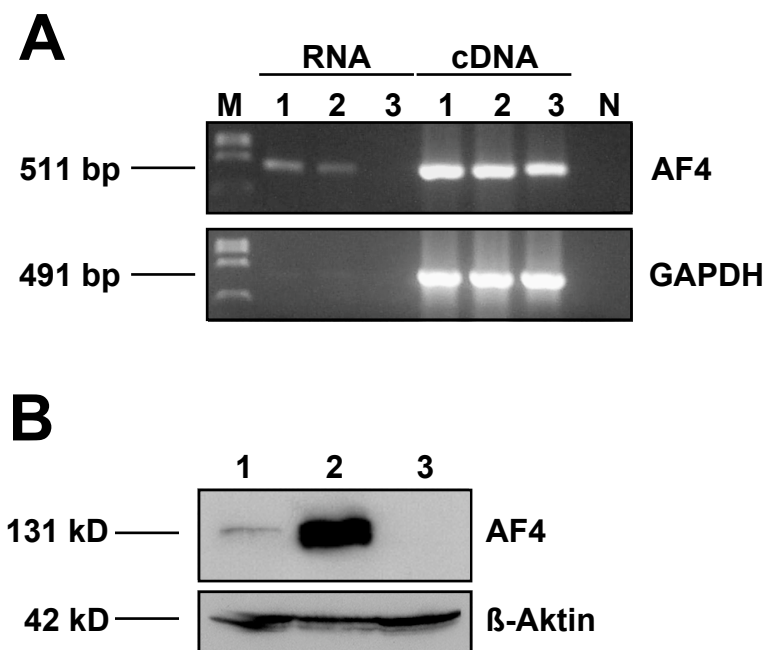


Abbildung 3-17: Proteasom-abhängiger Abbau von AF4

Untersucht wurde die mRNA- (A) und Proteinkonzentration (B) von AF4 in: Spuren 1: AF4 transfizierten 293T Zellen; Spuren 2: AF4 transfizierten und mit MG132 behandelten 293T Zellen; Spuren 3: nicht-transfizierten 293T Zellen. **A.** RT-PCR Experimente. M: Größenstandard \square *Clal*; N: Wasser-Kontrolle. Als positiv-Kontrolle für die cDNA-Synthesen und als Ladekontrolle wurde die Untersuchung von *GAPDH* herangezogen. Primerkombinationen für die jeweiligen Reaktionen: *AF4*: AF4•324b x AF4•52; *GAPDH*: GAPDH•3 x GAPDH•5. **B.** Western Blot Untersuchungen. Aufgetragen wurde wie oben beschrieben Gesamtzell-Lysat und das AF4 Protein wurde mit dem Antikörper anti-AF4•N nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde \square -Aktin in dem eingesetzten Lysat nachgewiesen.

In den RT-PCR Untersuchungen konnte eine leichte Erhöhung der mRNA-Menge in den AF4 transfizierten 293T Zellen festgestellt werden (Abbildung 3-17A, Spuren 1 und 2). Allerdings wurde auf RNA-Ebene in nicht-transfizierten Zellen ebenfalls eine starke Expression des endogenen *AF4* Gens festgestellt (Abbildung 3-17A, Spur 3). Im Gegensatz dazu konnte in den Western Blot Experimenten das AF4 Protein nur in AF4 transfizierten Zellen detektiert werden, wobei die Inkubation der Zellen mit MG132 zu einem dramatischen Anstieg der AF4 Proteinmenge führte (Abbildung 3-17B, Spur 1 und 2). Damit wurde deutlich, dass überexprimiertes AF4 Protein effizient von endogenem SIAH1 Protein gebunden und dem proteasomalen Abbau zugeführt wurde. Endogenes AF4 Protein konnte im Western Blot nicht

nachgewiesen werden (Abbildung 3-17B, Spur 3), was ebenfalls für einen schnellen, SIAH1-vermittelten Abbau des AF4 Proteins sprach.

Um der Fragestellung nachzugehen, ob das AF4•MLL Fusionsprotein ebenfalls ein SIAH1 Substrat darstellt, wurden 293T Fibroblasten, wie oben für AF4 beschrieben, mit dem Expressionsvektor pTARGET-Sfineu/AF4•MLL transfiziert.

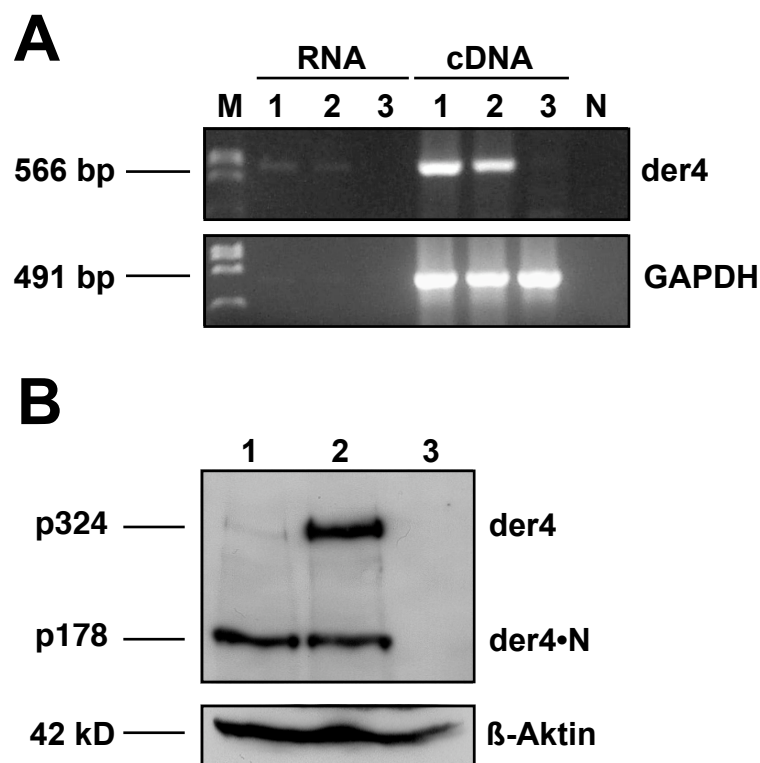


Abbildung 3-18: Untersuchung der Proteinstabilität des AF4•MLL Fusionsproteins
 Untersucht wurde die mRNA- (A) und Proteinkonzentration (B) des AF4•MLL Fusionsproteins in: Spuren 1: AF4•MLL transfizierten 293T Zellen; Spuren 2: AF4•MLL transfizierten und mit MG132 behandelten 293T Zellen; Spuren 3: nicht-transfizierten 293T Zellen. **A.** RT-PCR Experimente. M: Größenstandard \square *Clal*; N: Wasser-Kontrolle. Als positiv-Kontrolle für die cDNA-Synthesen und als Ladekontrolle diente die Untersuchung von *GAPDH*. Primerkombinationen für die jeweiligen Reaktionen: *AF4•MLL* (*der4*): *AF4•324b* x *12•5*; *GAPDH*: *GAPDH•3* x *GAPDH•5*. **B.** Western Blot Untersuchungen. Aufgetragenes Gesamtzell-Lysat wurde mit dem Antikörper anti-AF4•N untersucht. p324: AF4•MLL *full-length* Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 324 kD; p178: N-terminales Peptidfragment (*der4•N*) des AF4•MLL Fusionsproteins, nach proteolytischer Spaltung, mit einem Molekulargewicht von 178 kD. Als Ladekontrolle wurde \square -Aktin in dem eingesetzten Lysat nachgewiesen.

Wie in Abbildung 3-18A dargestellt, war die mRNA für das AF4•MLL Fusionsprotein natürlich nur nach Transfektion in 293T Zellen darstellbar (Abbildung 3-18A, Spuren 1 und 2). In den Western Blot Experimenten wurde das gesamte AF4•MLL Fusionsprotein (p324) nur nach Inkubation der Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 deutlich sichtbar (Abbildung 3-18B, Spur 2), was ebenfalls für eine Interaktion mit dem endogenen SIAH1 Protein und einen raschen, Proteasom-abhängigen Abbau des AF4•MLL Fusionsproteins sprach. Zusätzlich wurde mit dem monoklonalen Antikörper anti-AF4•N eine zweite spezifische Proteinbande detektiert, die, unabhängig von einer Vorinkubation der 293T Zellen mit MG132, stabil vorhanden war (Abbildung 3-18B, Spur 1 und 2). Der Größe nach entsprach diese zweite Proteinspezies (p178) dem N-terminalen Spaltprodukt (der4•N) des AF4•MLL Fusionsproteins nach proteolytischer Spaltung durch Taspase1 (Hsieh, 2003a). Taspase1 scheint also das AF4•MLL Fusionsprotein ebenso wie das MLL Wildtypprotein, an den konservierten Protease-Erkennungssequenzen CS1 und CS2, zu hydrolysieren (Yokoyama, 2002; Hsieh, 2003b). Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass die resultierenden Protein Fragmente der•N (p178) und MLL•C (p134) über die FYRN und FYRC/SET Domänen interagieren und dadurch zu einem stabilen der4•N/MLL•C Protein-Komplex führen.

3.6.3 Interaktion und Stabilisierung der proteolytischen Spaltprodukte der4•N und MLL•C

Experimentell konnte die Interaktion, zwischen den Proteinfragmenten der4•N (p178) und MLL•C (p134), und die damit verbundene Stabilisierung des intramolekularen der4•N/MLL•C Komplexes durch Immunpräzipitations Untersuchungen bewiesen werden. Dazu wurden 293T Zellen mit dem Expressionskonstrukt für AF4•MLL und SIAH1 co-transfiziert und in An- oder Abwesenheit des Proteasom-Inhibitors MG132 inkubiert (Abbildung 3-19). Gesamtzell-Lysat von untransfizierten und AF4•MLL- und SIAH1 co-transfizierten (\pm MG132) Zellen wurde mit dem polyklonalen Antikörper anti-MLL•C, welcher sein Epitop im C-Terminus des humanen MLL Proteins hat, präzipitiert. Das erhaltene Präzipitat wurde ebenfalls mit dem anti-MLL•C Antikörper im Immunoblot untersucht.

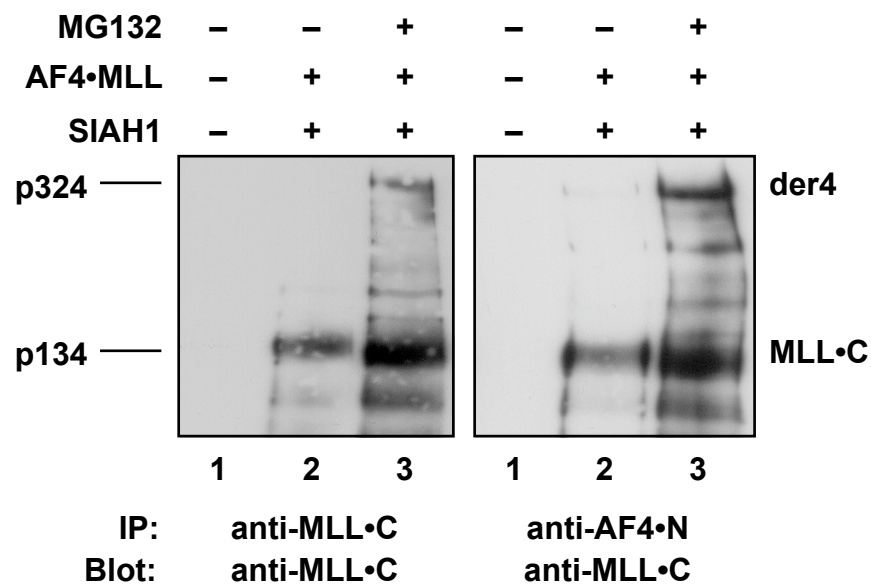


Abbildung 3-19: Darstellung des der4•N/MLL•C Komplex - Interaktion und Stabilisierung der proteolytischen Spaltprodukte der4•N und MLL•C

In Immunopräzipitations Analysen wurden nicht-transfizierte (1) und AF4•MLL/SIAH1 co-transfizierte 293T Zellen in Ab- (2) und Anwesenheit (3) von MG132 untersucht. Präzipitiert wurde mit dem Antikörper anti-MLL•C (linkes Bild) oder anti-AF4•N (rechtes Bild) und im Immunoblot mit dem Antikörper anti-MLL•C geprobt. p324: AF4•MLL *full-length* Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 324 kD; p134: C-terminales Peptidfragment (MLL•C) des AF4•MLL Fusionsproteins, nach proteolytischer Spaltung, mit einem Molekulargewicht von 134 kD.

Wie in Abbildung 3-19 (linkes Bild) dargestellt, konnte das MLL•C Protein Fragment präzipitiert und somit erneut die proteolytische Spaltung des AF4•MLL Fusionsproteins nachgewiesen werden. Außerdem konnte das MLL•C Protein, wie bereits das der4•N Protein, in MG132 unbehandelten Zellen stabil nachgewiesen werden (Abbildung 3-19; linkes Bild, Spur 2). Das AF4•MLL *full-length* Protein konnte dagegen nur aus Lysat MG132 behandelter Zellen präzipitiert werden (Abbildung 3-19; linkes Bild, Spur 3). Desweiteren konnte in Immunopräzipitationen mit dem anti-AF4•N Antikörper (Abbildung 3-19, rechtes Bild), neben dem AF4•MLL *full-length* Protein (Spur 3), das MLL•C Proteinfragment präzipitiert werden (Spuren 2 und 3), womit letztendlich auch eine Interaktion zwischen den beiden Protein Fragmenten der4•N und MLL•C belegt werden konnte. Auch in diesem Immunpräzipitations Experiment konnte in MG132 unbehandelten Zellen nur das MLL•C Protein, nicht aber das AF4•MLL *full-length* Protein, nachgewiesen werden (Abbildung 3-19; rechtes Bild, Spur 2).

3.6.4 Verifizierung der intramolekularen der4•N und MLL•C Proteininteraktion

In den folgenden Experimenten sollte zum einen geklärt werden, ob die Interaktion zwischen den beiden Spaltprodukten der4•N und MLL•C auch tatsächlich über Sequenzmotive des MLL Proteins, nämlich der FYRN- und FYRC/SET-Domäne, zustande kommt. Zum anderen sollten Interaktions Studien mit dem SIAH1 Protein und dem AF4•MLL Fusionsprotein bzw. dem der4•N/MLL•C Komplex durchgeführt werden. 293T Zellen wurden dazu, wie in Abbildung 3-20 dargestellt, mit den Expressionskonstrukten für AF4•MLL bzw. AF4 und SIAH1 co-transfiziert und in Immunoblot Analysen untersucht.

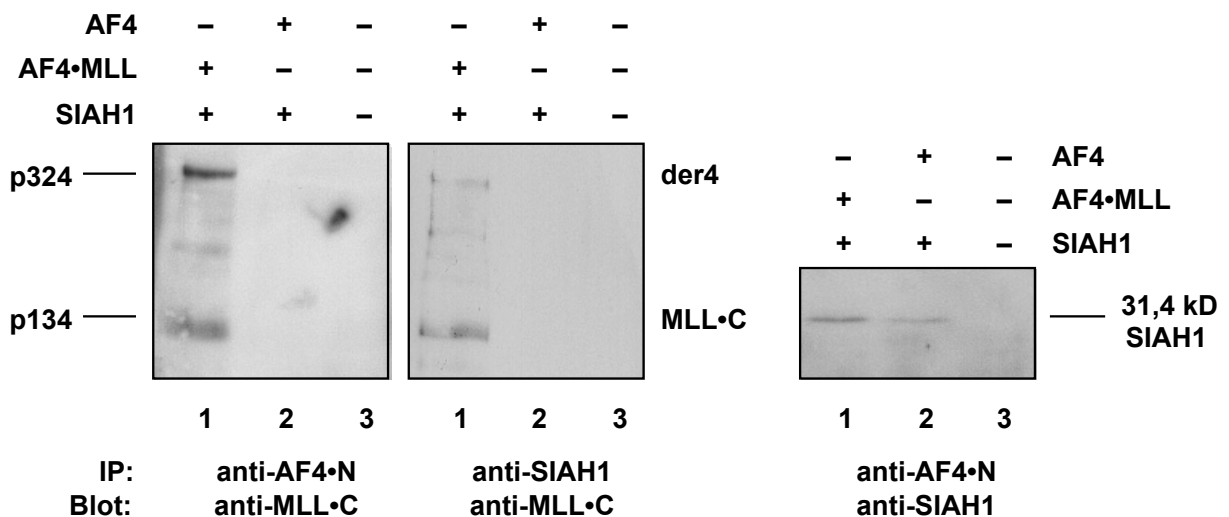


Abbildung 3-20: Darstellung der SIAH1 Proteininteraktionen mit AF4, *full-length* AF4•MLL und dem der4•N/MLL•C Komplex

In Immunopräzipitations Analysen wurden AF4•MLL und SIAH1 (1) bzw. AF4 und SIAH1 (2) co-transfizierte und nicht-transfizierte (3) 293T Zellen untersucht. Präzipitiert wurde mit dem Antikörper anti-AF4•N (linkes Bild) oder anti-SIAH1 (mittleres Bild) und im Immunoblot mit dem Antikörper anti-MLL•C geprobt. p324: AF4•MLL *full-length* Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 324 kD; p134: C-terminales Peptidfragment (MLL•C) des AF4•MLL Fusionsproteins, nach proteolytischer Spaltung, mit einem Molekulargewicht von 134 kD. Umgekehrt wurde in einem Kontrollexperiment Gesamtzell-Lysat entsprechend transfizierter 293T Zellen mit dem Antikörper anti-AF4•N immunpräzipitiert und anschließend mit dem Antikörper anti-SIAH1 untersucht (rechtes Bild).

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen den Protein Fragmenten der4•N und MLL•C in jedem Fall auf Proteinsequenzen des MLL Proteins zurückzuführen ist, da Interaktionen des MLL•C Peptids mit AF4 Protein Domänen

ausgeschlossen werden konnten (Abbildung 3-20; linkes Bild, Spur 2). Interessanterweise konnte für das SIAH1 Protein, neben der Bindung an das AF4•MLL *full-length* Protein, auch eine Bindung an den der4•N/MLL•C Komplex festgestellt werden, da mit dem anti-SIAH1 Antikörper nicht nur das ungespaltene AF4•MLL Fusionsprotein, sondern auch das MLL•C Spaltprodukt präzipitiert wurde (Abbildung 3-20; mittleres Bild, Spur 1). Umgekehrt konnte in einem Kontrollexperiment das SIAH1 Protein mit dem anti-AF4•N Antikörper sowohl in AF4•MLL und SIAH1 als auch in AF4 und SIAH1 co-transfizierten 293T Zellen co-präzipitiert werden (Abbildung 3-20; rechtes Bild, Spur 1 und 2).

3.6.5 Stabilität des der4•N/MLL•C Komplex in t(4;11)-abgeleiteten Zell-Linien

Um einen ersten Eindruck zu erhalten, wie sich die Situation tatsächlich in t(4;11)-assoziierten Leukämie-Zellen darstellt, wurden die drei t(4;11)-Zelllinien SEM, MV4;11 und RS4;11 zur Untersuchung herangezogen. Dazu wurde Gesamtzell-Lysat MG132 behandelter und un behandelter Zellen im Western Blot mit dem anti-MLL•C Antikörper untersucht. Aus dem Lysat MG132 behandelter Zellen konnte, wie in Abbildung 3-21 dargestellt, sowohl das AF4•MLL *full-length* Protein als auch das MLL•C Protein des der4•N/MLL•C Komplexes nachgewiesen werden (Spur 1, 3 und 5). Dagegen war in den un behandelten Zellen nur das MLL•C Spaltprodukt festzustellen (Spur 2, 4 und 6), womit auch in leukämischen t(4;11) Zellen eine Akkumulation des intramolekularen der4•N/MLL•C Proteinkomplexes gezeigt werden konnte, obwohl hier keine Überexpression wie in den Transfektions-Experimenten vorlag.

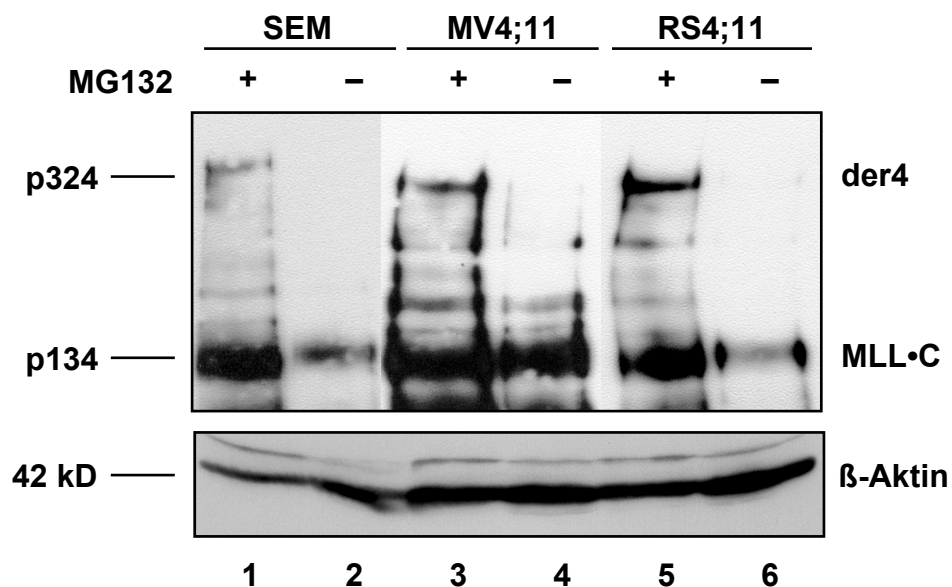


Abbildung 3-21: Untersuchung des der4•N/MLL•C Komplex in t(4;11) Leukämie Zelllinien
 Untersucht wurde Gesamtzell-Lysat der t(4;11)-Linien SEM (1:+MG132; 2: -MG132), MV4;11 (3:+MG132; 4: -MG132) und RS4;11 (5:+MG132; 6: -MG132) in Western Blot Experimenten. Die Proteine AF4•MLL (der4, p324) und MLL•C (p134) wurden mit dem Antikörper anti-MLL•C detektiert. Die Untersuchung von β-Aktin diente als Ladekontrolle.

3.7 Pathomolekulares Modell zur Entstehung einer t(4;11)-assoziierten Leukämie

Basierend auf den Ergebnissen des *Focus Formation Assays* und den Interaktionsstudien mit dem AF4•MLL Fusionsprotein konnte für t(4;11) Translokationen ein erster pathomolekularer Mechanismus für diese Leukämie-Entität erstellt werden. Nach diesem Modell (Abbildung 3-22) kommt es analog dem humanen MLL Wildtyp Protein, zu einer spezifischen, proteolytischen Spaltung des AF4•MLL Fusionsproteins an den Taspase1-Konsensussequenzen CS1 und CS2. Die resultierenden Peptidfragmente der4•N (p178) und MLL•C (p134) bilden im Anschluß über die FYRN- und FYRC/SET-Domänen den der4•N/MLL•C Komplex; Dieser ist gegenüber einer SIAH1-vermittelten Degradation durch das Proteasom stabil. Aufgrund dieser Interaktion akkumuliert der der4•N/MLL•C Komplex und kann sein onkogenes Potential, vermittelt über den N-Terminus des AF4 Proteins, entfalten. Der Mechanismus der Wachstumstransformation ist noch abzuklären, es ist jedoch naheliegend, dass die Bildung des der4•N/MLL•C Proteinkomplexes das SIAH-System kompromittiert, und, dass die starke Akkumulation in Konkurrenz zum MLL-MPSC Komplex tritt. Dies käme einem funktionellen *knock-out* des endogenen und intakten MLL Proteins gleich. Zusammenfassend bedeutet das, dass die Anwesenheit des der4•N/MLL•C Proteinkomplexes drei verschiedene genetische Hits auslösen kann.

Abbildung3-1: **A.** Proteolytische Spaltung des MLL Wildtyp Proteins innerhalb der internen Konsensus-Sequenzen CS1 und CS2 durch Taspase1. Die entstandenen Protein Fragmente MLL•N (p290) und MLL•C (p134) interagieren miteinander unter Ausbildung des MLL•N/MLL•C Komplex. Dieser Proteinkomplex bildet seinerseits die molekulare Plattform zur Assemblierung des MLL Multi-Protein Super-Komplexes, welcher neben MLL•N und MLL•C aus mindestens 27 zusätzlichen Proteinen besteht (Nakamura, 2002; Yokoyama, 2002; Hsieh, 2003a; Hsieh, 2003b).

B. Proteolytische Spaltung des AF4•MLL Fusionsproteins unter Bildung des der4•N/MLL•C Komplexes (der4•N, p178; MLL•C, p134) und daraus resultierende Konsequenzen. Das AF4•MLL Fusionsprotein (p324) interagiert mit SIAH1 und wird dem Proteasom-abhängigen Abbau überführt, während der der4•N/MLL•C Proteinkomplex ebenfalls mit SIAH1 interagiert, aber gegen eine proteosomale Degradation resistent ist. Durch die Stabilisierung kommt es zur Entfaltung des onkogenen Potentials über den der4•N/MLL•C Komplex.

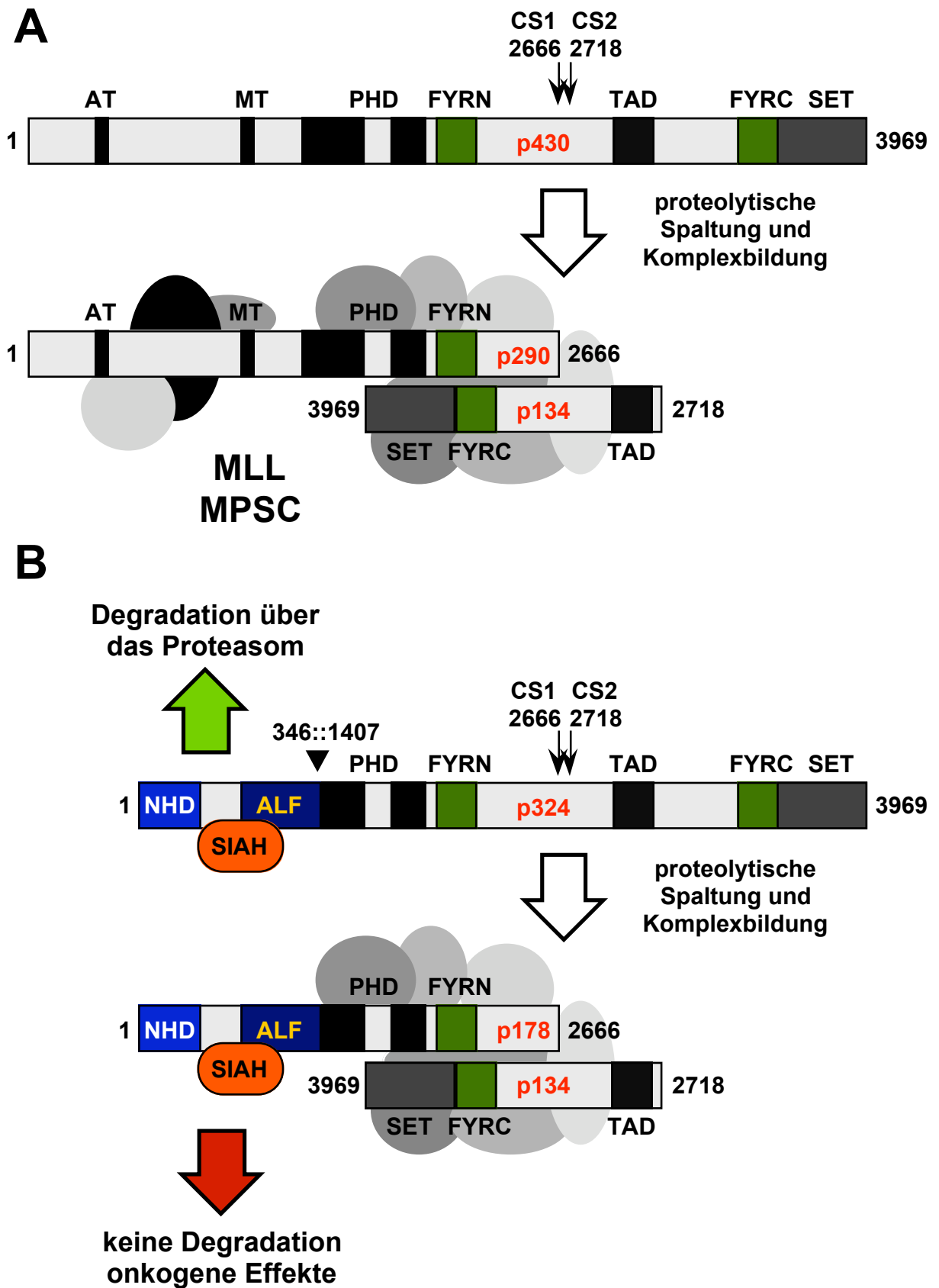


Abbildung 3-22: Schematische Darstellung der prozessierten Proteinkomplexe für MLL und AF4-MLL

4 Diskussion

4.1 Definition des Wildtyp AF4 Proteins und des AF4•MLL Fusionsproteins als Proto- bzw. Onkoprotein

Die große Vielzahl von chimären Fusionsproteinen und die hohe Variabilität der Leukämien, die nach einem Rearrangement am Genlocus 11q23 entstehen, erschweren es, einen einheitlichen onkogenen Mechanismus für die Leukämieentstehung zu formulieren. Der kleinste gemeinsame Nenner der resultierenden Fusionsproteine ist der N-terminale Bereich des *MLL* Gens, der für die AT-Haken und die MT Domäne kodiert und mit den unterschiedlichen C-terminalen Bereichen der Translokationspartner fusioniert. Die Diversität der *MLL* Fusionspartner und das Auftreten von Leukämie-assoziierten, partiellen Duplikationen und Deletionen des *MLL* Gens führten zu der Hypothese, dass ausschliesslich Fusionsproteine, die über den N-Terminus des *MLL* Proteins verfügen (der11), das biologisch relevante Onkogen darstellen (Rowley, 1992). Anhand von *knock-out* Modellen konnte gezeigt werden, dass sich der Verlust der SET und PHD Domänen eines *MLL* Allels auf die normale Hämatopoiese auswirkt und damit ein Zusammenhang mit den Deletionen bei *MLL*-assoziiierter MDS besteht (Harbott, 1998). Ein dominant-negativer Aktivierungsmodus, bei dem das verkürzte *MLL* Protein die Funktion des normalen Proteins stören würde, ist jedoch nicht ausreichend für die Transformation. Corral *et al.* tauschten in murinen ES Zellen ein intaktes *MLL* Allel gegen ein verkürztes *MLL* bzw. ein *MLL-AF9* Fusionskonstrukt aus, wobei diese rearrangierten *MLL* Gene unter den eigenen, endogenen Promotor des *MLL* platziert wurden. Chimäre Mäuse mit dem *MLL-AF9* Fusionskonstrukt entwickelten nach einer Latenzzeit von acht Monaten eine akute myeloische Leukämie, während chimäre Mäuse mit dem lediglich verkürzten *MLL* keine hämatologischen Abnormitäten zeigten (Corral, 1996). Auch in weiteren Publikationen konnte durch funktionelle Experimente gezeigt werden, dass sowohl der *MLL*-Anteil als auch der jeweilige Translokationspartner wichtig und notwendig für die Leukämogenese ist (Lavau, 1997; Slany, 1998). Für eine Reihe weiterer *MLL*-Fusionen konnte nach retroviraler Transduktion in hämatopoietische Vorläuferzellen

gezeigt werden, dass sie onkogenes Potential besitzen und eine Leukämogenese in Mausmodellen initiieren und aufrechterhalten können (DiMartino, 1999; Lavau, 2000a; Lavau, 2000b). Dagegen konnte für einige andere MLL Translokationsprodukte, unter anderem auch für das AF4•MLL Fusionsprotein, bislang kein transformierendes Potential in den verwendeten Zell- oder Maus-Systemen gezeigt werden (Strehl, 2003; Lavau, 2004; Bangerter, Dissertation 2001).

Da der N-terminale Bereich des MLL Proteins DNA-Bindung vermittelt, wird zudem angenommen, dass dadurch der fusionierte C-Terminus der Partnerproteine in die Nähe der MLL Zielgene gelangt. Diese Annahme wird durch den Befund unterstützt, dass die subnukleäre Lokalisation der MLL Fusionsproteine identisch ist mit der des Wildtypproteins (Yano, 1997). Die Vermutung liegt daher nahe, dass die Translokationspartner nicht nur einen Einfluss auf die maligne Transformation haben, sondern auch die unterschiedlichen Ausprägungen der resultierenden Leukämien bedingen. Dies könnte auch der Grund dafür sein, dass t(4;11) Translokationen immer mit akuten lymphatischen Leukämien verbunden sind, die zu einem sehr frühen Zeitpunkt auftreten. In einem Mausmodell wurde gezeigt, dass die Expression von *mAF4* im hämatopoietischen System eine wichtige Stellung einnimmt. So hatte die Inaktivierung des *mAF4* Gens eine starke Reduktion von B- und T-Zellen in den Mäusen zur Folge. Daraus wurde die Schlußfolgerung gezogen, dass die Funktion des murinen AF4 Proteins für die Entwicklung der Lymphozyten kritisch ist (Isnard, 2000). Die Vermutung, dass die Assoziation von AF4 mit funktionellen Bereichen des MLL Proteins durch die Translokation den onkogenen Prozeß in Richtung der lymphoiden Linie orientieren könnte, wurde dadurch zusätzlich bestärkt.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Zellsystem etabliert werden, welches die Untersuchung der potentiell onkogenen Wirkung der Fusionsproteine MLL•AF4 und AF4•MLL bzw. des AF4 Wildtypproteins ermöglichte. Dazu wurde ein Tetracyclin-induzierbares Expressions-System in Maus embryonalen Fibroblasten (MEF) verwendet. Die Expression der Transgene *MLL•AF4*, *AF4•MLL*, *AF4* und *H-ras** wurde in An- und Abwesenheit von Tetracyclin getestet. Das Wachstums-transformierende Potential wurde im *Focus Formation Assay* untersucht. In dem verwendeten biologischen System führte die Expression des AF4 Wildtypproteins und des AF4•MLL Fusionsproteins zum Verlust der Kontakt-Inhibition und damit zu

einem Wachstums-transformierten Phänotyp der Zellen. Dagegen hatte die Expression des MLL•AF4 Fusionsproteins keinen Einfluß auf das Wachstum und die Morphologie der transfizierten MEF Zellen. Die Bildung zellulärer Foci, die sowohl in der Ausprägung als auch in der Anzahl der Positivkontrolle mit H-ras* entsprach, zeigte eindrucksvoll, dass es sich bei dem AF4 Protein um ein Proto-Onkoprotein und bei dem AF4•MLL Fusionsprotein um ein Onkoprotein handelt. Der gemeinsame Bereich zwischen den beiden Proteinen beschränkt sich auf die ersten 360 Aminosäuren des AF4 Proteins (AF4•N) und wird von den ersten drei Exons des AF4 Gens kodiert. Deshalb wurde die Hypothese abgeleitet, dass der N-terminale Bereich des AF4 Proteins (AF4•N) für das onkogene Potential in murinen embryonalen Fibroblasten verantwortlich ist. Überträgt man die aufgestellte Arbeitshypothese auf eine t(4;11)-assoziierte Leukämie, so wäre für dieses MLL Rearrangement die Leukämogenese von dem reziproken Fusionsprotein AF4•MLL abhängig. Damit hätte der MLL Translokationspartner AF4 nicht nur akzessorischen Einfluss auf die Auswirkung der Translokation und die Ausprägung der Leukämieform, sondern wäre durch den AF4•N Anteil direkt für die Transformation und damit die Leukämogenese verantwortlich.

4.2 Regulation der AF4 und AF4•MLL Proteinstabilität über die E3 Ubiquitin Ligase SIAH1

Die Translokation t(4;11), die mit einer aggressiven pro-B ALL im Kindesalter assoziiert ist, stellt das am häufigsten vorkommende MLL Rearrangement dar. So wird in annähernd 40% aller untersuchten MLL Translokationen das AF4 Gen als Translokationspartner identifiziert (Johansson, 1998). Neben dem AF4 Protein gehören die Proteine FMR2, LAF4 und AF5q31 zu der ALF Proteinfamilie, die sich durch fünf hochkonservierte Proteindomänen auszeichnet (Gecz, 1996; Gu, 1996; Nilson, 1997; Taki, 1999). Aufgrund der für das AF4 und LAF4 Protein beschriebenen transkriptionellen Aktivierung, wurde angenommen, dass es sich bei dieser Proteinfamilie um Transkriptionsfaktoren handelt (Prasad, 1995; Ma und Staudt, 1996; Morrissey, 1997). Die genaue biologische Funktion des AF4 Proteins ist allerdings bislang nicht geklärt. Aus diesem Grund und aufgrund der Ergebnisse

im *Focus Formation Assay* wurden Teile des AF4 Proteins für *Yeast Two-Hybrid* Experimente verwendet. Interaktionspartner konnten dabei mit dem N-terminalen Bereich des AF4 Proteins (AF4•N) identifiziert werden. Die Mehrzahl der untersuchten Interaktionsklone kodierte für die offenen Leserahmen der beiden Proteine SIAH1 (24%) und SIAH2 (27%). Die Interaktion des AF4•N Proteins mit den beiden SIAH Proteinen wurde durch verschiedene *in vitro* und *in vivo* Experimente verifiziert und ist daher absolut spezifisch. Die identifizierten Interaktionspartner SIAH1 und SIAH2 stellen beide E3 Ubiquitin Ligasen dar und wurden erst vor wenigen Jahren entdeckt (Hu, 1997a). Die beiden als Tumor Suppressor Proteine klassifizierten SIAH Proteine binden spezifisch an Zielproteine, um diese nach erfolgter Ubiquitinylierung der proteolytischen Degradation am Proteasom zuzuführen.

Als Kontaktdomäne für die Interaktion des AF4•N Proteins mit dem SIAH1 Protein kann die hochkonservierte ALF Domäne innerhalb des AF4 Wildtyp Proteins angesehen werden. Diese verfügt nämlich über das konservierte Bindemotiv PxAxVxP, welches für die Bindung des SIAH1 Proteins beschrieben wurde (House, 2003). Unterstützt wird diese Annahme durch Daten einer erst kürzlich publizierten AF4 Mutation in Mäusen (Isaacs, 2003). Die sogenannte *robotic* Mausmutante weist eine Missense-Mutation (V294A) innerhalb des PxAxVxP Bindemotives des murinen AF4 Proteins auf. Von House *et al.* wurde gezeigt, dass der Austausch des Valins durch eine andere Aminosäure eine verminderte Bindungs-Effizienz des SIAH1 Proteins um 70% zur Folge hat (House, 2003). Die stark eingeschränkte motorische Funktion, die mit einem dramatischen Verlust an Purkinje-Zellen im Kleinhirn zusammenhängt, könnte daher auf eine erhöhte Konzentration an mutiertem AF4 Protein zurückzuführen sein.

In Proteasom-Inhibitor Experimenten konnten die dramatischen Unterschiede in der zellulären Abundanz des AF4•N Proteins, aber auch des AF4 Wildtypproteins, deutlich gezeigt werden. Der starke Anstieg der AF4•N und AF4 Proteinmenge bei einer Inhibition des Proteasoms zeigte, dass sowohl AF4•N als auch AF4 strikt der Kontrolle durch das SIAH1 Protein unterliegen. Somit hat eine Interaktion des AF4 N-Terminus mit dem SIAH1 Protein die Ubiquitinylierung und anschließende Degradation über das Proteasom zur Folge. Aufgrund der vorliegenden Daten kann

für das AF4 Wildtypprotein zusammengefasst werden, dass es sich hierbei um ein Proto-Onkoprotein handelt, dessen zelluläre Abundanz auf Proteinebene durch die spezifische Interaktion mit dem SIAH1 Protein strikt kontrolliert wird.

Für das AF4•MLL Fusionsprotein, welches über den N-terminalen Bereich des AF4 Wildtypproteins und damit über das SIAH1 Bindemotiv verfügt, konnte ebenfalls eine Interaktion mit der E3 Ubiquitin Ligase SIAH1 demonstriert werden. Die Untersuchung der SIAH1-vermittelten Degradation zeigte allerdings, dass der proteasomale Abbau des AF4•MLL Fusionsproteins nur mit Einschränkungen möglich ist. So zeigten die Experimente unter Einsatz des Proteasom-Inhibitors MG132 sehr deutlich, dass ein effizienter, SIAH1-vermittelter Abbau nur für das ungespaltene AF4•MLL *full-length* Protein (der4) stattfindet. Dagegen führt die spezifische Proteolyse des AF4•MLL Fusionsproteins zu den beiden Proteinfragmenten der4•N (p324) und MLL•C (p134). Die Interaktion dieser beiden Proteinfragmente führt zur Bildung des der4•N/MLL•C Proteinkomplexes, der gegenüber einer SIAH1-vermittelten Degradation resistent ist. Die proteolytische Spaltung und anschließende Komplexierung der Proteinfragmente der4•N und MLL•C ist analog zum Mechanismus der Spaltung des Wildtyp MLL Proteins. Dabei spaltet die Endopeptidase Taspase1 das humane MLL Protein innerhalb der zwei konservierten Erkennungssequenzen (CS1 und CS2). Die resultierenden Peptidfragmente MLL•N und MLL•C interagieren anschließend über die FYRN- und FYRC/SET-Domänen zu dem MLL•N/MLL•C Proteinkomplex. Dieser wiederum bildet die Plattform für die Bildung des MLL Multiprotein Superkomplexes (MLL MPSC), wobei mindestens 27 weitere Proteine assemblieren.

Die proteolytische Spaltung des AF4•MLL Fusionsproteins und die anschließende Komplexierung der Proteinfragmente der4•N und MLL•C konnte auch experimentell bestätigt werden. Durch Immunopräzipitations-Experimente in An- und Abwesenheit des Proteasom-Inhibitors MG132 konnte gezeigt werden, dass die beiden Proteine der4•N und MLL•C spezifisch miteinander interagieren und dabei auch in Abwesenheit von MG132 stabil in der Zelle vorliegen. Interessanterweise kann der Komplex aus der4•N und MLL•C nach wie vor an das SIAH1 Protein binden, ist aber vom proteolytischen Abbau über das Proteasom ausgeschlossen. Da der der4•N/MLL•C Proteinkomplex die effiziente Kontrolle der Zelle unterläuft, kommt es

zur Akkumulation des prozessierten und komplexierten AF4•MLL Fusionsproteins in der Zelle. Damit können für das AF4•MLL Fusionsprotein mehrere Charakteristika zusammengefasst werden, die sehr wahrscheinlich für das transformierende Potential des AF4•MLL Fusionsproteins verantwortlich sind. Zum einen verfügt das AF4•MLL Fusionsprotein über den N-terminalen Bereich (AF4•N) des AF4 Proteins, welcher das Wachstums-transformierende Prinzip darstellt und zudem für den SIAH1-abhängigen Kontroll-Mechanismus zur strikten Regulation der AF4 Proteinmenge verantwortlich ist. Zum anderen ermöglicht der MLL Fusionsanteil den proteolytischen Spaltmechanismus durch Taspase1 und stellt die Interaktionsdomänen FYRN und FYRC/SET zur Verfügung. Die Kombination dieser Charakteristika innerhalb des AF4•MLL Fusionsproteins führt durch die Komplexierung der Spaltprodukte zu einer Blockade des SIAH1-abhängigen Degradations-Systems, wodurch verschiedene genetische Ereignisse zur malignen Transformation der Zellen beitragen.

4.3 Diskussion des pathomolekularen Modells zur Entstehung einer t(4;11)-assoziierten Leukämie

Das *MLL* Gen auf dem Genlocus 11q23 ist von einer Vielzahl an verschiedenen chromosomalen Translokationen betroffen. Zum jetzigen Zeitpunkt sind über 50 unterschiedliche Translokationspartner für das *MLL* Gen beschrieben, die in zwei Gruppen zusammengefasst werden können. Die erste Gruppe an Translokationsgenen kodiert hauptsächlich für cytoplasmatische Proteine. Obwohl diese Gruppe eine hohe Diversität an Fusionspartnern aufweist, findet man die entsprechenden Translokationen nur selten in Leukämie-Patienten. Die zweite Gruppe stellt den Hauptanteil der *MLL* Translokationen und die betroffenen Translokationsgene kodieren für nukleäre Transkriptionsfaktoren oder Co-Faktoren. Innerhalb dieser Gruppe machen drei Translokationen, nämlich t(4;11), t(9;11) und t(11;19), 75% aller diagnostizierten Fälle aus.

In aktuelleren Arbeiten konnten für einige *MLL* Fusionen dieser beiden Gruppen Modellvorstellungen zur Transformation abgeleitet werden. So wurde für die Gruppe

der nukleären Translokationspartner ein molekularer Mechanismus demonstriert, bei dem allein der biologische Prozess der transkriptionellen Aktivierung für das transformierende Potential zuständig ist. So konnte unabhängig von zwei Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die artifizielle Fusion des MLL N-Terminus mit einer starken Transaktivator-Domäne, wie der Herpes simplex VP16 Aktivierungsdomäne, zur Immortalisierung von primären Knochenmarkszellen ausreicht (So und Cleary, 2003; Zeisig, 2003).

Ein zweiter Mechanismus basiert auf der Di- oder Oligomerisierung der chimären MLL Fusionsproteine. Dieser Mechanismus gilt hauptsächlich für cytoplasmatische Translokationspartner, die entsprechende Dimerisierungs-Domänen zur Verfügung stellen. Für die Oligomerisierungs-Domänen der Fusionspartner AF1p und GAS7 konnte gezeigt werden, dass sie sowohl notwendig als auch hinreichend für eine maligne Transformation durch die entsprechenden MLL Fusionsproteine sind (So, 2003). Ausserdem führte eine künstlich induzierte Dimerisierung des verkürzten MLL Proteins zur Immortalisierung von Knochenmarkszellen (Martin, 2003). Unabhängig vom Mechanismus der zur transkriptionellen Aktivierung führt, verdichten sich die Hinweise dafür, dass die maligne Transformation von der Transaktivierung der MLL-Zielgene *Hoxa7*, *Hoxa9* und *Meis1* abhängt (Martin, 2003; So und Cleary, 2003; So, 2003; Zeisig, 2003).

Für eine Translokation t(4;11) besitzt keines der beiden Modelle Gültigkeit, zumal in einer aktuellen Studie gezeigt wurde, dass das MLL•AF4 Fusionsprotein keinen Einfluss auf die Hox Genexpression hat (Bertrand, 2003). Transfektions-Experimente mit dem MLL•AF4 Protein zeigten ausserdem, dass die MLL•AF4 Überexpression zu einem Wachstums-Stopp und einer Akkumulation der Zellen in G1 führte (Caslini, 2004). Deshalb ist es sehr unwahrscheinlich, dass infolge einer t(4;11) Translokation das transformierende Potential alleine vom MLL•AF4 Fusionsprotein ausgeht.

Basierend auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann nun für die Translokation t(4;11) und die daraus resultierende Leukämie-Entität ein erster pathomolekularer Mechanismus postuliert werden. Er beruht auf der Akkumulation des AF4•MLL Fusionsproteins. Die Beobachtung, dass ein schneller und effizienter Abbau des der4•N/MLL•C Proteinkomplexes durch das SIAH1 Protein nicht mehr möglich ist, könnte verschiedene biologische Prozesse beeinflussen, die letztlich alle zur malignen Transformation der Zelle beitragen. Das AF4•MLL Fusionsprotein

kodiert im N-Terminus für eine DNA-Bindungs Domäne, die zwischen den Domänen NHD und ALF lokalisiert wurde (Nilson, 1997). Die biologische Aktivität dieser DNA-Bindungs-Domäne könnte zudem durch die fusionierten MLL Proteinsequenzen gefördert werden. Der C-Terminus des MLL Proteins vermittelt nämlich die Assemblierung Chromatin-modulierender Proteinkomplexe, die innerhalb des MLL Multiprotein Superkomplexes für die Modifizierung und Reorganisation von Chromatin verantwortlich sind. Deshalb könnte eine Fusion von Teilen des AF4 und MLL Proteins die Etablierung von ektopen Expressionsmustern zur Folge haben. Die Aktivierung von AF4 Zielgenen könnte dabei wesentlich für die Transformation der Zellen verantwortlich sein. Um ein besseres Verständnis über die molekularen Ereignisse zu erhalten, ist in zukünftigen Experimenten die Untersuchung der resultierenden Genexpressionsmuster unerlässlich.

Zwei weitere genetische Ereignisse, die zur Transformation der Zellen beitragen könnten, ergeben sich durch die kompetitive Situation innerhalb der Zellen. Zum einen ist es möglich, dass der akkumulierte der4•N/MLL•C Proteinkomplex um Faktoren des MLL MPSC Komplexes kompetitiert. Wenn dadurch die Assemblierung eines intakten MLL MPSC Komplexes unmöglich wird, käme dies einem funktionellen *knock-out* des endogenen MLL Proteins gleich. Da das SIAH1 Protein zwar vom der4•N/MLL•C Proteinkomplex gebunden wird, jedoch nicht mehr in der Lage ist dessen Abbau zu vermitteln, wäre es zum anderen denkbar, dass das SIAH1 Protein in diesem Proteinkomplex zurückgehalten wird. Dies könnte die enzymatische Funktion des SIAH1 Proteins massiv beeinträchtigen, so dass es für die Bindung anderer Zielproteine und deren Abbau nicht mehr zur Verfügung steht. Dies wiederum würde einer funktionellen Inaktivierung des SIAH1 Proteins entsprechen. Die Inaktivierung von SIAH1 führt in SIAH1 *knock-out* Mäusen zu einem gestörten Zellzyklus und einer erhöhten Proliferationsrate. Damit einher geht der Verlust der Tumor Suppression und der Fähigkeit Apoptose zu induzieren (Bruzzone-Giovanelli, 1999; Roperch, 1999). Interessanterweise konnte bei SIAH2 *knock-out* Mäusen sogar eine Erhöhung der myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark festgestellt werden (Frew, 2003).

Obwohl die präsentierten Daten zum größten Teil durch Transfektions-Experimente in murinen Fibroblasten erhalten wurden, konnte für drei t(4;11)-Leukämie-Zelllinien

ebenfalls eine Akkumulation des der4•N/MLL•C Proteinkomplexes demonstriert werden. Es ist daher anzunehmen, dass die diskutierten Mechanismen für die Leukämogenese durch eine t(4;11) Translokation wichtig sind. Abgesehen von der Bedeutung des AF4•MLL Fusionsproteins für eine t(4;11)-assoziierte Leukämie, könnte der hier beschriebene pathomolekulare Mechanismus auch für die Fusionsproteine LAF4•MLL und AF5q31•MLL, die aus den chromosomalen Translokationen t(2;11)(q11,q23) bzw. t(5;11)(q31,q23) resultieren, Gültigkeit haben. Da die beiden MLL Fusionsproteine LAF4 und AF5q31 Mitglieder der ALF-Familie darstellen, verfügen sie wie das AF4 Protein auch über das konservierte Binde-Motiv für SIAH1. Eine proteolytische Spaltung der Fusionsproteine und anschließende Komplexierung der Spaltprodukte wäre über die C-terminalen MLL Proteinsequenzen möglich. Somit wäre für diese beiden anderen MLL Translokationen ein analoger Mechanismus denkbar. Damit ist aber auch der Grundstein gelegt, um über erste therapeutische Möglichkeiten nachzudenken. Der hier skizzierte pathomolekulare Mechanismus zeigt deutlich auf, dass die Proteolyse durch Taspase1 und die anschließende Komplexierung der resultierenden Proteinfragmente die molekulare Grundlage des malignen Mechanismus darstellen. Interferenz mit diesen beiden Vorgängen sollte nach dem vorliegenden Konzept den malignen Mechanismus unterbinden. Deshalb werden diese beiden Teilreaktionen derzeit intensiv untersucht um eine therapeutische Option auszuloten.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien, Geräte und ihre Bezugsquellen

Substanzen	Bezugsquelle (Firma)
λ-DNA (für DNA-Marker)	MBI Fermentas
λ-Mercaptoethanol	Roth
Acrylamid	Roth
Agar	Sigma
Agarose	Invitrogen
Aminosäuremix (-Ade; -His; -Leu; -Trp)	Clontech
Ampicillin	Roth
APOD	Roth
Aprotinin	Sigma
Bacto-Pepton	Difco
Bacto-Trypton	Difco
Benzamidin	Sigma
Bisacrylamid	Roth
BSA	Roth
CPRG	Boehringer
DMSO	Sigma
dNTPs	Peqlab
DTBP	Pierce
DTT	Roth
EDTA	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Gelatine	Merck
Glutathion-Sepharose Beads	Sigma
Glycerin 86%	Roth
Glycin	Roth
GSH (Glutathione, reduced)	Fluka
HEPES	Roth

Hybond™-P	Amersham
IPTG	Saxon
L-[³⁵ S] - Methionin (1000 Ci/mMol)	Amersham
Leupeptin	Sigma
Lysozym	Sigma
MG 132	Calbiochem
Molekulargewichtsmarker für SDS-PAGE	NEB New England Biolabs
MTT	Merck
Na ₃ VO ₄	Sigma
PEG 1000	Merck
PEG 3550/6000/8000	Sigma
Pepstatin A	Sigma
PMSF	Sigma
Ponceau S	Sigma
Protein A-Agarose/G-Agarose	Sigma
RNAasin	Promega
Röntgen-Fixierlösung	Tetenal
Röntgen-Rapid-Entwickler	Tetenal
Salmon Sperm Carrier DNA	Clontech
Sarkosyl	Sigma
SDS	Biomol
TEMED (N, N, N', N',-Tetramethylethylendiamin)	Sigma
Tetracyclin	Sigma
Triton-X100	Sigma
Trockenmilch (non-fat)	USA (TOPS)
Tween 20	Sigma
X-Gal	Roth
Yeast Extract	Difco
Yeast Nitrogen Base w/o amino acids	Difco

Nährmedien und Zusatzstoffe

Bezugsquelle

β-Mercaptoethanol (100 mM)	Invitrogen
DMEM	Invitrogen
FCS	Invitrogen

Glutamin (30 mg/ml)	Invitrogen
Hygromycin B	Roche
Natriumpyruvat (100 mM)	Invitrogen
nicht essentielle Aminosäuren	Invitrogen
PBS	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)	Invitrogen
RPMI 1640	Invitrogen
Trypan Blue Stain	Invitrogen

Geräte	Hersteller
Abi Prism 310 Genetic Analyzer	PE Applied Biosystems
Blotting-Apparatur für Western Blots	Fröbel
Brutschränke	Heraeus
Elisa-Reader MR5000	Dynatech
Geltrockner	Fröbel
Gene Pulser™	Bio Rad
Gene Quant RNA/DNA-Calculator	Pharmacia
Mikroskop	Nikon
PCR-Geräte	PE Applied Biosystems
pH-Meter	Inolab
Rotationsschüttler	Infors
Speed Vac Concentrator	Heraeus
Spektralphotometer Hitachi U 2000	Colora
SterilGard Hood (LaminAir HB2427)	Heraeus
Ultraschallgerät Sonoplus HD-70	Bandelin
UV-Schirm (TFX-20M)	Life Technologies
Votrex-2 Genie	Scientific Industries
Wasserbad	Julabo
Zählkammer	Brand Neubauer
Zell-Kulturinkubatoren	Heraeus

Zentrifugen	Hersteller
J2-HS	Beckmann
J6-HC	Beckmann

Rotixa/P	Hettich
Tischzentrifuge 5414C	Eppendorf
Tischzentrifuge 5702	Eppendorf

Sonstiges Material	Bezugsquelle
3MM Chromatographiepapier	Whatman
BCA Protein Assay Kit	Pierce
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer
ECL-Kit	Amersham
FuGene (Transfektionsreagenz)	Roche
MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3	Clontech
Pretransformed MATCHMAKER Libraries	Clontech
pTARGET™ Mammalian Expression System	Promega
Qiagen Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiagen PCR Purification Kit	Qiagen
Qiagen Spin Plasmid Kit	Qiagen
Röntgenfilme	Fujifilm
TNT [□] T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega
Wizard [□] Plus DNA Purification System	Promega

Enzyme	Bezugsquelle
Restriktionsendonukleasen (und Puffer)	NEB New England Biolabs
Polymerasen	EuroGentech
	Eppendorf
DNA-Ligase	Roche
T4-Polynukleotidkinase	NEB New England Biolabs
alkalische Phosphatase	Roche
RNAse	Sigma
Lyticase	Fluka
Klenow-Fragment	NEB New England Biolabs
Superscript™ Reverse Transkriptase	Invitrogen

5.1.2 Allgemeine Puffer und Lösungen

Wo nicht anders beschrieben sind Puffer und Lösungen bekannten Protokollsammlungen entnommen (*Molecular Cloning* von Sambrook *et al.*, 2. Auflage, 1989).

5.1.3 Verwendete Organismen

Bakterienstämme	Genotyp
JM109	rec A1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96, relA1, thi, \square (lac-pro AB), F' (traD36, proAB ⁺ , lac ^q lacZ \square M15)
Top10	mcrA, \square (mrr-hsdRMS-mcrBC), \square 80 \square lacZ \square M15, \square lacX74, deoR, recA1, AraD139, \square (ara,leu), 7697, ga/U, ga/K, \square , rspL, (strep ^R), endA1, nupG
SureTM	recB, recJ, sbcC201, uvrC, Tn5, (kan ^R), mcrA, mcrB, mrr lac, \square (hsdRMS), endA1, gyrA96, thi, relA1, supE44 [F', proAB, laq ^q Z \square M15, Tn10 (tet ^R)]
W3110	F ⁻ IN (rrnD-rrnE)1 lambda ⁻ ; (ATCC 27325)

Medien für <i>E.coli</i>	Zusammensetzung
YT-Medium	1 % Bacto Tryptone 0,5 % Yeast Extract 0,5 % NaCl
YT-Agar	1,2 % Agar
YT _{amp} -Medium	100 µg/ml Ampicillin
YT _{kan} -Medium	25 µg/ml Kanamycin

Hefestämme	Genotyp	Referenzen
AH109	<i>MATa</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4</i> \square , <i>gal80</i> \square , <i>LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2</i> , <i>URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	(James, 1996)
Y187	<i>MAT</i> \square , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>gal4</i> \square , <i>met</i> , <i>gal80</i> \square , <i>URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	(Harper, 1993)

Medien für <i>S.cerevisiae</i>	Zusammensetzung
YPD	20 g/l Difco Peptone 10 g/l Yeast Extract 2 % Glukose 20 g/l Agar (nur für Platten)
YPDA	0,003 % Adenin
YPDA _{kan}	15 μ g/ml Kanamycin
SD-Medium	6,7 g/l Yeast nitrogen base w/o amino acids 2 % Glukose 20 g/l Agar
SD ^{-Leu-Trp}	0,63 g/l DO Supplement -LEU, -TRP
SD ^{-Ade-His-Leu-Trp}	0,6 g/l DO Supplement -ADE, -HIS, -LEU, -TRP
SD ^{-Leu}	SD ^{-Leu-Trp} 0,1 g/l Tryptophan
SD ^{-Trp}	SD ^{-Leu-Trp} 0,1 g/l Leucin

Zell-Linien	Zelltyp	Medium	Referenzen
MEF/tTA	pTet-Off stabil transfizierte murine embryonale Fibroblasten; Regulator-Plasmid kodiert für Tetracyclin-abhängigen Transaktivator	DMEM	Clontech
HEK-293T	humane Nierenkarzinom-Zelllinie	DMEM	ATCC CRL11268
SEM	humane lymphoblastische Leukämie mit einer Translokation t(4;11) CD13 ⁺ , CD15 ⁺ , CD19 ⁺ , CD20 ⁻ , CD22 ⁺ , CD24 ⁻ , CD33 ⁺ , CDw65 ⁺ , CDw75 ⁺	RPMI1640	(Greil, 1994)
MV4;11	humane myeloische Leukämie mit einer Translokation t(4;11) CD3 ⁺ , CD4 ⁺ , CD5 ⁻ , CD8 ⁻ , CD10 ⁻ , CD13 ⁺ , CD14 ⁻ , CD15 ⁺ , CD19 ⁻ , CD21 ⁻ , CD25 ⁻ , CD33 ⁺ , CD37 ⁻ , DR ⁺	RPMI1640	(Lange, 1987) ATCC CRL9591
RS4;11	humane myeloische Leukämie mit einer Translokation t(4;11)	RPMI1640	ATCC CRL1873
K562	humane Erythroleukämie-Zelllinie	RPMI1640	ATCC CCL243
6E9/5	Antikörper-sezernierende Hybridoma-Zelllinie	RPMI1640	(Moritz, Diplomarbeit 2002)

Die Kultivierung aller Säugerzelllinien erfolgte bei 5% CO₂, 95% relativer Luftfeuchtigkeit und einer Temperatur von 37°C. Alle Nährmedien wurden mit 10% (v/v) FCS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin und 2 mM L-Glutamin supplementiert. Das Medium für die Zelllinie MEF/tTA enthielt zusätzlich 100 µg/ml G418. Das Medium für die Zelllinie 6E9/5 wurde mit 5% FCS, 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin, 10 mM L-Glutamin, 50 µM β-Mercaptoethanol, 2 mM Natriumpyruvat und 1% (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren supplementiert.

5.1.4 Synthetische Oligonukleotide

Die für Klonierungen und Sequenzierungen benötigten und verwendeten Oligonukleotide sind im Folgenden aufgelistet. Alle Oligonukleotide wurden in Auftragssynthese von den Firmen Pharmacia oder Biospring hergestellt.

Als Linker verwendete Oligonukleotide

SFI•3	5'-AATTCGGCCTCACTGGCCATCGATGGCCAGTGAGGCCG-3'
SFI•5	5'-GCCGGAGTGACCGGTAGCTACCGGTCACTCCGGCCTAG-3'
Sfiheidi	5'-AATTCGGCCTCACTGGCCTCTAGAGGCCAGTGAGGCCG-3'

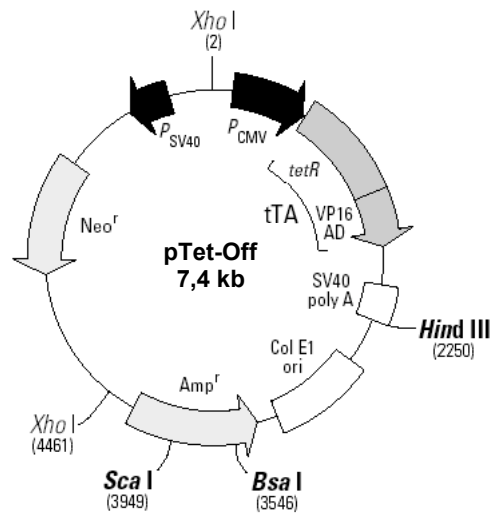
Oligonukleotide für Klonierungen, Sequenzierungen und PCR-Analysen

pUHD•3	5'-CCTGGAGACGCCATCCACG-3'
pUHD•5	5'-TTCAGTGCATTCTAGTTGTGG-3'
GAPDH•3	5'-CTTCACCACCATGGAGAAGG-3'
GAPDH•5	5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'
AF4-N•3	5'-ATGGCAGCCCAGTCAATGTTGTAC-3'
AF4-N•5	5'-CTCAACTGACTGAGAAGGCATCTT-3'
AF4•324b	5'-GACAGATTCGGCTCCAGAG-3'
AF4•52	5'-GAATCTCTTCAACACAATGGAC-3'
12•5	5'-GGAAGGGCTCACAACAGAC-3'
8•3	5'-CCCAAACCACTCCTAGTGAG-3'
AF4•5	5'-ACTGTCACTGTCCTCACTGTCA-3'
ras•3	5'-ATGACAGAATACAAGCTTGTGG-3'
ras•5	5'-CACTTGCGAGCTCATGCAGCC-3'
T7	5'-AATACGACTCACTATAGG-3'
AD•5	5'-AGATGGTGCACGATGCACAG-3'
BD•5	5'-TTTTCGTTTTAAACCTAAGAGT-3'
pACT•3	5'-CTATTCGATGATGAAGATACC-3'
pACT•5	5'-GCACAGTTGAAGTGAAGTTGC-3'
AF4-N•3(Nde)	5'-CGAATTCCATATGGCAGCCCAGTCAAGTTTGTAC-3'
AF4-N•5(Sfi)	5'-GGAATTCGGCCTCCATGGCCTCAACTGACTGAGAAGGCATCTT-3'

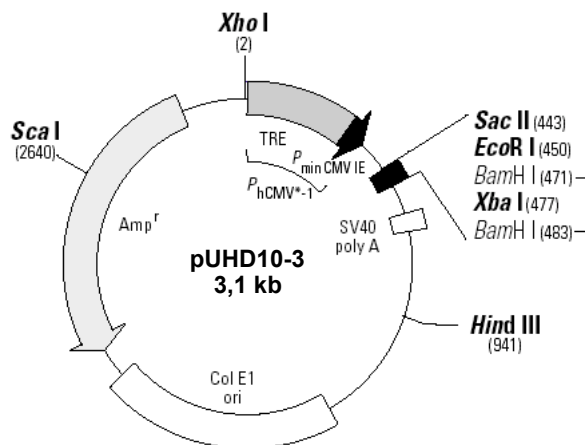
AF4-C•3(Nde) 5'-CGAATTCCATATGCAGACCTACTCCAATGAAGTCCATT-3'
AF4-C•5(Sfi) 5'-GGAATTCGGCCTCCATGGCCATTAAGGTGTTTTGGTTAATTCTTG-3'
AF4-I•5(Sfi) 5'-GGAATTCGGCCTCCATGGCCGGTCTCTTTATCATGGACTTTC-3'
AF4-II•3(Nde) 5'-CGAATTCCATATGCCTCAAGACAGTTTGGTGGC-3'
AF4-II•5(Sfi) 5'-GGAATTCGGCCTCCATGGCCCTGGCTGACTTTGGTCAGCC-3'
AF4-III•3(Nde) 5'-CGAATTCCATATGCCACGTGCGCCACCAGAG-3'
AF4-III•5(Sfi) 5'-GGAATTCGGCCTCCATGGCCCCGCCTTGACCTCTTAAGTGC-3'
AF4-IV•3(Nde) 5'-CGAATTCCATATGGAAGCAGACACCTGTGGCCA-3'
S1-N•3(Nde) 5'-CGAATTCCATATGAGCCGTCAGACTGCTACAGC-3'
S1-C•5(Sfi) 5'-GGAATTCGGCCTCCATGGCCTCAACACATGGAAATAGTTACATT-3'
S2-N•3(Nde) 5'-CGAATTCCATATGAGCCGCCCCTCCACCG-3'
S2-C•5(Sfi) 5'-GGAATTCGGCCTCCATGGCCTCATGGACAACATGTAGAAATAGT-3'
AF4-N•3(Bam) 5'-GCGGATCCGCAGCCCAGTCAATGTTGTAC-3'
S1•3(Hind) 5'-GCAAGCTTCGAGCCGTCAGACTGCTACAGCA-3'
S2•3(Bam) 5'-GCGGATCCAGCCGCCCCTCCACCGGC-3'
SIAH1(ATG)•3 5'-ATGAGCCGTCAGACTGCTACAGCATT-3'
SIAH1(ATG)•5 5'-TCAACACATGGAAATAGTTACATTGAT-3'
SIAH2(ATG)•3 5'-ATGAGCCGCCCCTCCACCGGCCCA-3'
SIAH2(ATG)•5 5'-TCATGGACAACATGTAGAAATAGTAAC-3'
pTarget•3 5'-ATTCTCCGCCCATGGCTGAC-3'
pTAR•5 5'-TGATTACGCCAAGTTATTTA-3'

5.1.5 Vektoren und Plasmide

Name	Beschreibung
pGEX5T	bakterieller, IPTG-induzierbarer Expressionsvektor; ermöglicht die Herstellung GST-markierter rekombinanter Proteine.
pTet-Off	Regulatorischer Expressionsvektor des <i>tet-off</i> Systems; exprimiert den Tetracyclin-abhängigen Transaktivator (tTA) unter dem starken immediate early CMV Promotor;



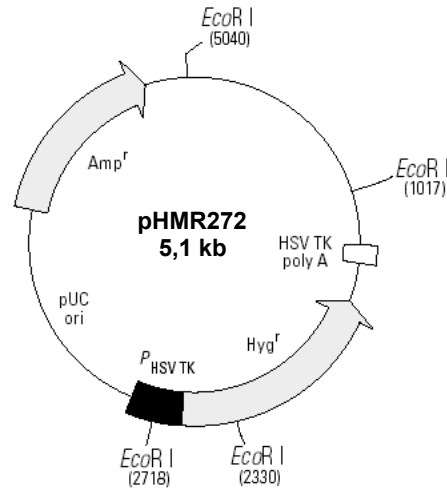
pUHD10-3	Tetracyclin-induzierbarer Response Vektor des <i>tet-off</i> Systems; Expression des Transgens wird über Bindung des tTA Proteins an die tet Operator Sequenzen reguliert;
-----------------	--



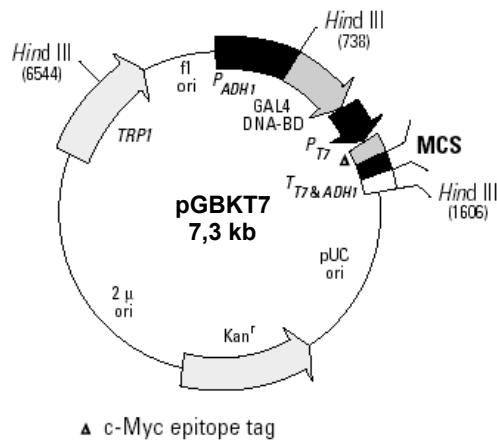
pUHD10-3	modifizierter pUHD10-3 Vektor (Abbildung 3-1);
-----------------	--

pHMR272-Hyg

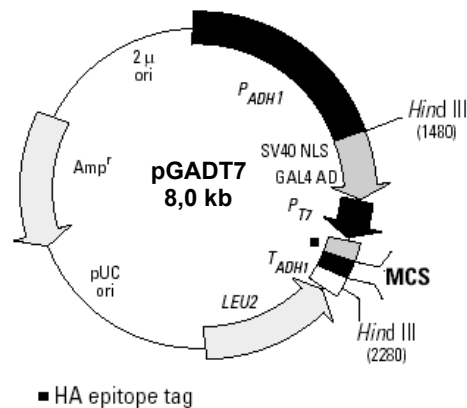
Hyg^R-vermittelnder Vektor zur Co-Transfektion mit dem pUHD10-3 Plasmid um eine Selektion transfizierter Zellen zu ermöglichen;

**pGBKT7**

Shuttle-Vektor für das *Yeast Two-Hybrid* System; trägt die Sequenz für die DNA-bindende Domäne von Gal4 (DNA-BD) vor der *mcs*.

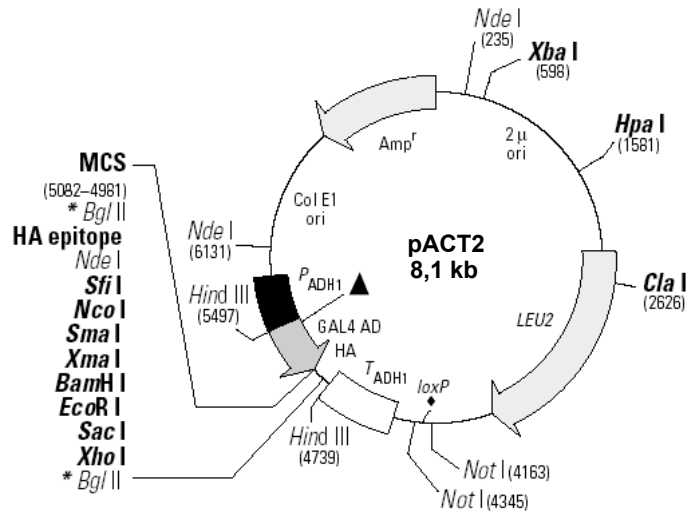
**pGADT7**

Shuttle-Vektor für das *Yeast Two-Hybrid* System; trägt die Sequenz für die Transkriptions-aktivierende Domäne von Gal4 (GAL4 AD) vor der *mcs*.



pACT2

Yeast Two-Hybrid Library Vektor; generiert eine Fusion mit der GAL4 AD.



pGBKT7-53

Kontroll-Vektor für das *Yeast Two-Hybrid* System; kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus dem Tumorsuppressor-Protein p53 und der DNA-BD.

pGBKT7-Lam

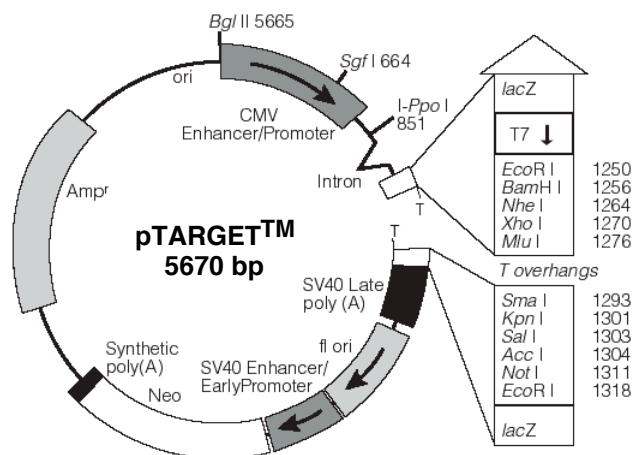
Kontroll-Vektor für das *Yeast Two-Hybrid* System; kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus dem humanen Lamin C Protein und der DNA-BD.

pGADT7-T

Kontroll-Vektor für das *Yeast Two-Hybrid* System; kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus dem großen T-Antigen des SV40 und der GAL4 AD.

pTARGET

Klonierungsvektor mit terminalem Überhang einer Thymin-Base zur Ligation von PCR Produkten; gewährleistet zudem eine effiziente Expression in Säugerzellen.



5.1.6 Antikörper

Primäre Antikörper:

Name	Verdünnung	Beschreibung
anti-c-Myc	1:1000	Maus monoklonaler Antikörper gegen ein synthetisches Peptid (AS 408-439) des humanen p62-c-Myc Proteins (Clontech)
anti-HA	1:1000	Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen das Hemagglutinin (HA) Epitop des humanen Influenza A Virus (Clontech)
anti-AF4•N	Überstand	Maus monoklonaler Antikörper gegen den N-Terminus des humanen AF4 Proteins; Hybridoma-Klon 6E9/5
anti-SIAH1	1:1000	Ziege polyklonaler Antikörper gegen eine N-terminale Region des humanen SIAH1 Protein; (P-18):sc-5506 (Santa Cruz Biotechnology)
anti-SIAH2	1:1000	Ziege polyklonaler Antikörper gegen eine N-terminale Region des humanen SIAH2 Protein; (N-14):sc-5507 (Santa Cruz Biotechnology)
anti-MLL•C (173)	1:500	Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des humanen MLL Proteins; (zur Verfügung gestellt von Dr. T. Nakamura und Dr. E. Canaani, Philadelphia, USA)
anti-Actin	1:1000	Kaninchen polyklonaler Antikörper gegen ein C-terminales Aktin-Fragment (Sigma)

Sekundäre Antikörper:

Name	Verdünnung	Beschreibung
anti-Mouse	1:10000	anti Maus Ig (Amersham)
anti-Rabbit	1:10000	anti Kaninchen Ig (Amersham)
anti-Goat	1:10000	anti Ziege Ig (Vector Laboratories)

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Standardmethoden

Die folgenden Standard-Methoden sind, wo nicht anders gekennzeichnet, den bereits genannten Protokollsammlungen entnommen (*Molecular Cloning* von Sambrook *et al*, 2. Auflage, 1989) und werden nicht ausführlich vorgestellt.

- Gelelektrophoresen (DNA und Protein)
- Isolierung von Gesamtzell-Extrakt
- Isolierung von Gesamt-RNA mit Trizol (GibcoBRL)
- Isolierung von genomischer DNA mit Triton X-100
- Isolierung von Plasmid DNA aus *E.coli* (Qiagen, Promega)
- Minilysat Präparation von Plasmid DNA nach der Methode der alkalischen Lyse
- Fällungsmethoden für Nukleinsäuren
- Dephosphorylierung von DNA 5' Enden mit alkalischer Phosphatase
- Auffüllreaktionen von überhängenden DNA Enden (fill-in)
- Kinasierungsreaktion von DNA 5' Enden mit T4 Polynukleotidkinase
- Ligations Reaktionen
- Phenol/Chloroform Extraktion von Nukleinsäuren
- Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
- Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford, oder BCA)
- Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen
- PCR Analysen
- Herstellung von CaCl₂- und Elektroporations-kompetenten *E.coli* Bakterien
- Transformation von *E.coli* mit CaCl₂
- Elektroporation von *E.coli*
- Protein-Induktionskinetik in *E.coli*
- Western Blot

5.2.2 Sequenzanalysen

DNA-Sequenzierungen wurden mit dem ABI Prism[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit durchgeführt. Die Reaktion erfolgte entsprechend der Hersteller-Anleitung nach der Kettenterminationsmethode. Sie ermöglicht eine auf unterschiedlichen Fluoreszenz-Signalen basierende Sequenzierung von Einzel- oder Doppelstrang-DNA im ABI Prism[™] 310 Genetic Analyzer.

5.3 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

5.3.1 Glutathion-S-Transferase (GST) fusionierte Proteine

Lösungen	Zusammensetzung
STE Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA 150 mM NaCl
Lysozym	10 mg/ml Lysozym in MQ
Elution Puffer	50 mM Tris-HCl pH 9,0 20 mM GSH (Glutathion, reduziert)
10% Sarkosyl	10 g Sarkosyl ad 100 ml STE Puffer
10% Triton X-100	10 ml Triton X-100 ad 100 ml STE Puffer

Für die Expression rekombinanter Proteine mit GST-Markierung wurden die entsprechenden Konstrukte in den IPTG-induzierbaren, bakteriellen Vektor pGEX5T kloniert und anschließend in den Bakterienstamm W3110 transformiert. Von den transformierten Bakterien wurde eine 20 ml Übernachtskultur in YT_{amp}-Medium bei 30°C hergestellt. 10 ml dieser Kultur wurden danach zum Animpfen einer 50 ml YT_{amp} Kultur verwendet. Nach 2 stündiger Inkubation bei 30°C und einer OD von 0,6 wurde mit 2 mM IPTG die Expression der GST-Fusionsproteine induziert. Für jeden Ansatz wurde jeweils auch eine nicht-induzierte Kultur mitgeführt. Die Bakterienkulturen wurden für weitere 3 h bei 30°C inkubiert, bevor sie bei 5.000 rpm

(JA10 Rotor Beckman) und 4°C abzentrifugiert wurden. Nach einmaligem Waschen mit eiskaltem 1x PBS und erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellpellets bei -80°C über Nacht eingefroren. Auf Eis wurden die Pellets aufgetaut und in 1 ml (pro 50 ml Kultur) STE Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl frisch hergestellter Lysozym-Lösung, wurden die Ansätze für 15 min auf Eis inkubiert und dann mit 10 µl 1M DTT und 140 µl 10%iger Sarkosyl-Lösung versetzt. Unter diesen Bedingungen wurden die Bakterien sonifiziert und im Anschluß bei 14.000 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 2 ml Cap überführt und nach Zugabe von 400 µl 10%igem Triton X-100 wurde mit STE Puffer auf ein Gesamtvolumen von 2 ml aufgefüllt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 100 µl Glutathion-Sepharose *beads* (50% *slurry*) zugegeben und es wurde für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Die Glutathion-Sepharose *beads* wurden dann bei 700 rpm für 5 min abzentrifugiert und anschließend noch dreimal mit 1x PBS gewaschen. Aufgenommen wurden die *beads* dann entweder in Elutions Puffer (FAR Western Analysen) oder in Wasch Puffer (GST *Pulldown* Assay).

5.3.2 *In vitro* Transkription und Translation

Die Expression von Proteinen *in vitro* wurde anhand des TNT[®] T7 Coupled Reticulocyte Lysate System von Promega nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

5.3.3 GST Pulldown Assay

Lösungen

Zusammensetzung

Wasch Puffer

20 mM Tris-HCl pH 7,5
 300 mM NaCl
 2 mM DTT
 0,2 % Triton X-100
 0,25% BSA

Die präzipitierten GST-Fusionsproteine (Glutathion-Sepharose *beads*) wurden in 1 ml Wasch Puffer aufgenommen und zusammen mit *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem Protein für 2 h auf Eis inkubiert. Eingesetzt wurden dafür 20 µl einer 50 µl *in vitro* Transkription/Translations- und Markierungs-Reaktion. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasch Puffer, wobei der letzte Waschdurchgang mit Wasch Puffer ohne BSA erfolgte, wurde die Glutathion-Sepharose abzentrifugiert und in 40 µl LowTE und 2x Lämmli aufgenommen. Die Analyse der co-präzipitierten Proteine erfolgte, nach kurzem Aufkochen, über SDS-Gelelektrophorese und anschließender radiologischer Untersuchung.

5.3.4 FAR Western Blot Analyse

Lösungen	Zusammensetzung
AC	10% Glycerol 100 mM NaCl 20 mM Tris-HCl pH 7,6 0,5 mM EDTA
AC-T	AC 0,1% Tween-20
Blocking Puffer	2 g <i>nonfat</i> Trockenmilch ad 100 ml AC-T

Für die FAR Western Experimente wurden die GST-Fusionsproteine zunächst von der Glutathion-Sepharose eluiert. Dazu wurden die *beads* in 50 µl Elutions Puffer (siehe 5.3.1) aufgenommen, mit 2x Lämmli versetzt und auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Die aufgetrennten Proteine wurden dann auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert und anschließend wurde die Membran zweimal mit 1x PBS und einmal mit kaltem AC-T Puffer gespült. Blockiert und gleichzeitig renaturiert wurde über Nacht bei 4°C in Blocking Puffer mit 1 mM DTT. Danach wurde die Membran mit den gesamten 50 µl einer *in vitro* Transkription/Translations- und Markierungs-Reaktion in 10 ml Blocking Puffer für 4h bei 4°C inkubiert. Gewaschen wurde die Membran einmal für 15 min in Blocking Puffer und weitere dreimal für 20 min in AC-T Puffer. Abschließend wurde die Membran kurz bei RT getrocknet und zur Exposition eines Röntgenfilms herangezogen.

5.4 Arbeiten mit Hefen

5.4.1 LiAc-Transfektion von Hefezellen

Lösungen	Zusammensetzung
100% DMSO	Sigma
50% PEG 3350	50 g PEG 3350 ad 100 ml MQ
10x TE (pH 7,5)	0,1 M Tris-HCl 10 mM EDTA
10x LiAc (pH 7,5)	1 M LiAc pH mit Essigsäure einstellen;
1x TE/LiAc-Lösung (10 ml)	1 ml 10x TE 1 ml 10x LiAc 8 ml MQ
PEG/LiAc-Lösung (10 ml)	8 ml 50% PEG 1 ml 10x TE 1 ml 10x LiAc

5.4.1.1 Herstellung LiAc-kompetenter Hefezellen

Eine 20 ml YPD-Kultur des Hefestammes AH109 wurde über Nacht (14-18 h) bei 30°C und 250 rpm bis zu einer OD_{600} von ungefähr 1,5 angezogen. Von dieser Übernachtskultur wurden 50 ml YPD-Medium so beimpft, dass eine OD_{600} von 0,2-0,3 erreicht wurde. Anschließend wurde die Kultur für weitere 3 h bei 30°C und 250 rpm inkubiert, um eine OD_{600} von $0,5 \pm 0,1$ zu erreichen. Das Ernten der Zellen erfolgte durch 5 minütige Zentrifugation bei 1.000 x g und Raumtemperatur (sterile 50 ml Sarstedt-Röhrchen). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 50 ml sterilem MilliQ-Wasser (MQ) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 1,5 ml frisch zubereiteter, steriler 1x TE/LiAc-Lösung aufgenommen und auf Eis gestellt.

5.4.1.2 *Transfektion der kompetenten Hefezellen*

Zur Einfach- oder Doppeltransfektion wurden folgende DNA-Mengen vorgelegt: 1 µg Gal4 DNA-BD Konstrukt; 1 µg Gal4 AD Konstrukt; 0,1 mg *salmon sperm carrier* DNA (vor Gebrauch 20 min aufgekocht). Dazu wurden dann 100 µl kompetente Hefezellen gegeben und gut gemischt. Nach Zugabe von 0,6 ml steriler, frisch angesetzter PEG/LiAc-Lösung wurden die Transfektionsansätze gevortext und anschließend für 30 min bei 30°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 70 µl DMSO versetzt, gemischt und einem 15 minütigen Hitzeschock (42°C) unterzogen. Anschließend wurden die Zellen für 2 min auf Eis gekühlt und dann für 5 sec bei 14.000 rpm in der Tischzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde abgezogen und verworfen, während die transfizierten Hefezellen in 0,5 ml 1x TE Puffer resuspendiert wurden. Die kompletten Transfektionsansätze wurde dann auf *SD-dropout* Platten mit dem notwendigen Selektionsdruck ausplattiert. Die Selektionsplatten wurden im 30°C Kulturraum bis zum Auftreten von Kolonien (3-5 Tage) inkubiert.

5.4.2 *Yeast Two-Hybrid Screen und MATCHMAKER Library*

Zur Durchführung der *Yeast Two-Hybrid Screens* wurde der Hefestamm AH109, wie in 5.4.1 beschrieben, mit dem entsprechenden Gal4 DNA-BD Konstrukt transfiziert. Die erhaltenen, transfizierten Hefezellen (Mata) wurden dann mit einer bereits in den Hefestamm Y187 (Mat⁺) transfizierten cDNA Knochenmark-Bank inkubiert und diploidisiert. Die *Pretransformed MATCHMAKER Library* wurde käuflich erworben und die Diploidisierung der beiden Hefestämme wurde nach Angaben des Herstellers (Clontech) durchgeführt. Die Bank besteht aus cDNA Fragmenten aus menschlichem Knochenmark mit einer durchschnittlichen Größe von 1,8 kb (0,6 - 4,0 kb), wobei nach der Zweitstrangsynthese alle cDNAs, die kleiner als 400 bp waren, entfernt wurden. Die Fragmente wurden durch reverse Transkription mit Oligo dT- und Random-Primern hergestellt und über *EcoRI* in den Vektor pACT2 (siehe 5.1.5) kloniert. Eine gerichtete Klonierung wurde gewährleistet durch die Verwendung von Oligo(dT)-Primern, die über eine vektorkompatible Restriktionsschnittstelle verfügen. Eine zweite Schnittstelle (bereits mit kohäsiven Enden) wird durch Ligation eines

EcoRI-Adapters bereitgestellt. Die Anzahl der unabhängigen Klone wurde, vor einer einmaligen Amplifikation der Bank in *E.coli*, getestet und beträgt $3,0 \times 10^6$.

Die Zellsuspension der diploiden Hefen wurde auf 50 große (15 cm) SD -Ade,-His,-Leu,-Trp Selektionsplatten ausgebracht. Zur Bestimmung der *Mating*-Effizienz wurden je 100 µl verschiedener Verdünnungsreihen (1:10.000; 1:1.000; 1:100; 1:10) auf entsprechende Selektionsplatten (SD -Leu; SD -Trp; SD -Leu,-Trp) ausgebracht. Die erhaltenen *Mating*-Effizienzen lagen zwischen 5 - 30%, was den Angaben des Herstellers entsprach.

5.4.3 Urea/SDS-Methode zur Preparation von Hefeextrakt

Lösungen	Zusammensetzung
Cracking Buffer (CB)	8 M Urea 5 % (w/v) SDS 40 mM Tris-HCl pH 6,8 0,1 mM EDTA 0,4 mg/ml Bromphenol-Blau
PMSF (100x)	0,1742 g PMSF 10 ml Isopropanol
Protease-Inhibitor-Lösung	0,1 mg/ml Pepstatin A 0,03 mM Leupeptin 145 mM Benzamidin 0,37 mg/ml Aprotinin
Cracking Buffer, komplett (CBK)	1 ml Cracking Buffer 10 µl β-Mercaptoethanol 70 µl Protease-Inhibitor-Lösung 50 µl PMSF (100x)

Eine Übernachtskultur wurde mit dem entsprechenden Selektionsmedium auf eine OD_{600} von 0,15 - 0,2 verdünnt (Gesamtvolumen 50 ml) und anschließend 4 h bei 30°C und 250 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,4 - 0,6 inkubiert. Nach Bestimmung der OD_{600} -Gesamteinheiten (OD_{600} mit dem Gesamtvolumen der Kultur multiplizieren), wurden die Zellen bei 1.000 x g und 4°C für 5 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 50 ml eiskaltem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und konnte

dann bei -80°C aufbewahrt werden. Zum Zellaufschluss wurde der Cracking Buffer, komplett hergestellt und zunächst auf 60°C erwärmt, bevor $100\ \mu\text{l}$ pro $7,5\ \text{OD}_{600}$ -Einheiten auf die tiefgefrorenen Zellen pipettiert und die Pellets darin resuspendiert wurden. Nach Zugabe von $80\ \mu\text{l}$ Glasbeads (Durchmesser $0,25\text{-}0,5\ \text{mm}$) auf $7,5\ \text{OD}_{600}$ -Einheiten wurde die Zellsuspension für $10\ \text{min}$ bei 70°C inkubiert und anschließend für $1\ \text{min}$ gevortext. Dann wurden die Zellen für $5\ \text{min}$ im Wasserbad gekocht und erneut für $1\ \text{min}$ gevortext. Die Glasbeads wurden mittels Zentrifugation bei 4°C , $14.000\ \text{rpm}$ und für $5\ \text{min}$ abgetrennt. Der erhaltene Proteinextrakt wurde in ein frisches Cap überführt und bei -20°C gelagert. Da PMSF in wässriger Lösung instabil ist, wurde während der gesamten Prozedur alle $15\ \text{min}$ erneut $1\ \mu\text{l}$ PMSF ($100\times$) zu der Zellsuspension gegeben.

5.4.4 Plasmidisolierung aus Hefe

Lösungen	Zusammensetzung
Lyticase-Lösung	20 mg Lyticase 1 ml LowTE pH 7,5
Lysepuffer	20% SDS

Im Reagenzglas wurden $2\ \text{ml}$ Selektionsmedium mit dem gewünschten Klon angeimpft und über Nacht bei 30°C und $250\ \text{rpm}$ inkubiert. Die Zellen wurden dann bei $6000\ \text{rpm}$ für $5\ \text{min}$ bei Raumtemperatur pelletiert und nach Abkippen des Überstandes im Rücklauf resuspendiert. Nach Zugabe von $15\ \mu\text{l}$ Lyticase-Lösung wurde der Ansatz bei 37°C und $200\ \text{rpm}$ für $90\ \text{min}$ zur Ausbildung von Hefesphäroblasten inkubiert. Anschließend wurden diese mit $20\ \mu\text{l}$ 20% SDS lysiert und für $1\ \text{min}$ gevortext. Die erhaltene Zellsuspension wurde für $20\ \text{min}$ bei -20°C eingefroren und anschließend wieder für $1\ \text{min}$ gevortext. Nach Zugabe von $200\ \mu\text{l}$ TE-Puffer pH 7,0 wurde mit $300\ \mu\text{l}$ Phenol extrahiert. Dazu wurde der Zellaufschluss $5\ \text{min}$ lang stark gevortext und dann bei $14.000\ \text{rpm}$ und RT für $10\ \text{min}$ zentrifugiert. Aus der abgezogenen, wässrigen Phase wurde dann die DNA bei -20°C für $1\ \text{h}$ durch Zugabe von $1/10$ Volumen NaOAc, pH 4,8 und $750\ \mu\text{l}$ 96% EtOH gefällt. Nach Zentrifugation für $20\ \text{min}$ bei $14000\ \text{rpm}$ wurde das Pellet mit $300\ \mu\text{l}$ 70% EtOH gewaschen, in $20\ \mu\text{l}$ MQ aufgenommen und in CaCl_2 -kompetente Bakterienzellen

transformiert. Je eine Hälfte des Transformationsansatzes wurde dabei auf die entsprechenden Selektionsplatten (YT_{amp} bzw. YT_{kan}) ausgebracht.

5.4.5 β -Galaktosidase Test (*Filter Lift Assay*)

Lösungen	Zusammensetzung
Z-Puffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O 40 mM NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O 10 mM KCl 10 mM MgSO ₄ •7H ₂ O
X-Gal Stocklösung	20 mg/ml X-Gal in DMF
Z-Puffer/X-Gal-Lösung	100 ml Z-Puffer 0,27 ml β -Mercaptoethanol 1,67 ml X-Gal Stocklösung

Mit Hilfe des β -Galaktosidase Tests lässt sich eine Transkriptionsaktivierung des *lacZ*-Reporter Gens nachweisen. In den Hefezellen gebildete β -Galaktosidase spaltet dabei zugegebenes X-Gal. Nach Hydrolyse mittels Luftsauerstoff entsteht ein schwer löslicher blauer Indigofarbstoff, der die jeweilige Hefezelle blau färbt. Um das Enzym aus den Hefezellen freizusetzen, ist es notwendig diese aufzuschließen. Dazu wurden potentiell positive Hefeklonen (Wachstum auf SD -Ade,-His,-Leu,-Trp) auf sogenannte Masterplatten überimpft und 3 - 5 Tage bei 30°C inkubiert. Von den hochgewachsenen Klonen wurden "Filter gezogen" auf denen die Hefen durch Behandlung mit flüssigem Stickstoff (freeze and thaw) aufgeschlossen und dann mit X-Gal behandelt wurden. Dazu wurden die an den Nitrocellulosefiltern haftenden Hefen 4-5mal in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Filter wurden dann, die Hefen kommen dabei oben zu liegen, in Petrischalen gelegt, die mit 3MM Papier ausgelegt waren. Das 3 MM Papier wurde anschließend mit 2-5 ml Z-Puffer/X-Gal-Lösung getränkt und die Platten bei 30°C inkubiert, wobei eine Blaufärbung nach 10-30 min zu beobachten war.

5.5 Arbeiten mit Säugerzellen

5.5.1 Transfektion der murinen Linie MEF/tTA und anschließende Selektion

Die Transfektion der MEF/tTA Zellen wurde mittels *FuGENETM6 Transfection Reagent* durchgeführt. Nach Angaben des Herstellers für stabile Transfektionen adhärenter Zellen, wurden einen Tag vor der Transfektion 1×10^5 (60 mm Platte) oder 1×10^6 (10 cm Platte) Zellen ausgebracht. Für die Transfektion wurden 96 μ l (60 mm) bzw. 282 μ l (10 cm) Serum-freies Medium vorgelegt. Entsprechend dem Transfektionsansatz wurden dann 6 μ l bzw. 18 μ l *FuGENETM6 Transfection Reagent* dazu pipettiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden diese Ansätze zu den entsprechend vorgelegten DNA-Konzentrationen von 2 μ g bzw. 6 μ g pipettiert (FuGENE/DNA-Verhältnis 3:1). Der Expressionsvektor pUHD10-3(Sfi)/*Transgen* und der pHMR272-Hyg Vektor wurden dabei in einem Verhältnis von 20:1 eingesetzt. Nach weiteren 15 min Inkubation bei RT wurden die Lösungen tröpfchenweise auf die vorher mit frischem Medium versehenen Zellen gegeben. Anschließend wurden die Transfektionsansätze für 48h im Inkubator kultiviert, bevor mit der Selektion begonnen wurde. Zur Selektion wurden 300 μ g/ml Hygromycin für alle transfizierten Zellen eingesetzt. Nach 3wöchiger Selektion konnten Einzelklone isoliert und expandiert werden.

5.5.2 MTT-Assay

Lösungen	Zusammensetzung
MTT-Lösung	25 mg MTT 10 ml PBS pH 7,4
Isoprop/HCl	96 ml Isopropanol 4 ml 1M HCl

Der MTT-Test ermöglicht die kolorimetrische Bestimmung der Zellzahl, wobei die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen gemessen wird, die den wasserlöslichen

gelben Farbstoff MTT zu einem wasserunlöslichen blauen Formazan umsetzen. Da die Aktivität dieser Enzyme von dem physiologischen Zustand der Zellen abhängt, kann zudem eine Aussage über die Zellvitalität getroffen werden.

Für den eigentlichen MTT-Test wurden 1×10^3 MEF/tTA Zellen in 96-Well-Platten ausgebracht, mit zunehmenden Konzentrationen an Hygromycin B versehen und für die gewünschte Zeitdauer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ l MTT-Lösung zu den Zellen gestartet. Nach Inkubation für 2 h bei 37°C wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit 100 μ l Isoprop/HCl lysiert. Nach Auflösen der Formazankristalle erfolgte die Messung am ELISA-Reader bei 550 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm.

5.5.3 Focus Formation Assay

Nicht-transfizierte und stabil transfizierte MEF/tTA Zellen wurden durch Trypsinisierung geerntet, mit 1x PBS gewaschen, in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und in einer Dichte von 1×10^4 Zellen in 60 mm Zellkulturschalen ausgebracht. Zur Kultivierung wurde DMEM mit 5% CS, 5% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 100 μ g/ml G418 und 300 μ g/ml Hygromycin B (stabil transfizierte MEF/tTA Linien) supplementiert. Für jede Linie wurden jeweils 3 Ansätze mit und ohne Doxycyclin (10 μ g/ml) ausgesät. Das Kulturmedium wurde jeden dritten bzw. vierten Tag gewechselt.

Nach einer Inkubationszeit von 14-21 Tagen wurden die Ansätze mit 1x PBS gewaschen, mit 3 ml einer 2%igen Formaldehyd-Lösung für 2 min bei RT fixiert, mit MQ gespült und mit 0,5 ml Methylenblau-Lösung (1 mg/ml) für 15 min bei RT gefärbt.

5.5.4 Transiente Transfektion der 293T Zell-Linie mit der CaPO₄-Methode

Lösungen

Zusammensetzung

2x HBS

281 mM NaCl
100 mM HEPES
1,5 mM Na₂HPO₄
pH 7,10 - 7,13 einstellen;
sterilfiltrieren

Da 293T Zellen sehr empfindlich sind gegen Erschütterung, mussten die Zellen vor der eigentlichen Transfektion auf gelatinisierten Platten ausgebracht werden. Dazu wurden die Platten mit ca. 6 ml einer 0,1%igen Gelatine-Lösung für mindestens 20 min behandelt. Die Gelatine-Lösung wurde dann abgezogen und die Zellen wie gewohnt ausgebracht. Am Tag vor der Transfektion, wenn die Zellen eine Konfluenz von 60 - 80% erreicht hatten, wurden sie einmal mit 1x PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt. Das CaPO_4 /DNA-Präzipitat wurde in 15 ml Sarstedt-Röhrchen vorbereitet. Dazu wurden die gewünschte DNA-Menge und 50 μl CaCl_2 (2,5 M) in MQ aufgenommen, so dass ein Gesamtvolumen von 500 μl erreicht wurde. Anschließend wurden 500 μl 2x HBS tropfenweise zu der CaCl_2 /DNA-Lösung gegeben, während gleichzeitig mit einer 2 ml Pipette in dem Ansatz "geblubbert" wurde. Nach ca. 20 sec "blubbern" wurde das Präzipitat tropfenweise zu den 293T Zellen pipettiert. Kurz vor Zugabe des Präzipitats wurden die Zellen mit 10 μl Chloroquin (25 mM) versehen. Inkubiert wurden die Zellen mit dem Präzipitat über Nacht im Brutschrank, bevor das Medium gewechselt wurde und die Zellen für weitere 24 oder 48 h im Brutschrank inkubiert wurden. Während dieser Zeit erforderten manche Experimente zudem eine Inkubation mit 10 μM MG132 für 6 - 24 h, bevor die Zellen geerntet und Proteinextrakte hergestellt wurden.

5.5.5 Herstellung von Gesamtextrakt aus 293T Zellen

Lösungen	Zusammensetzung
IP-Lyse Puffer	150 mM NaCl 20 mM HEPES pH 7,2 - 7,5 1% Triton X-100 0,4 mM EDTA
Protease Inhibitoren	100 mM PMSF 1 mg/ml Pepstatin A 5 mg/ml Leupeptin 2,1 mg/ml Aprotinin
Phosphatase Inhibitor	50 mM Na_3VO_4

IP-Lyse Puffer, komplett	100 µl PMSF
	10 µl Pepstatin A
	2 µl Leupeptin
	4,76 µl Aprotinin
	125 µl Na ₃ VO ₄
	ad 10 ml IP-Lyse Puffer

Für die Herstellung der Proteinextrakte wurden die transient transfizierten 293T Zellen pelletiert, mit 1 ml 1x PBS gewaschen und dabei in ein Eppendorf-Cap überführt. Sollten die Zellextrakte für Co-Immunopräzipitationen eingesetzt werden, so wurden die Zellen, zur Kreuzvernetzung interagierender Proteine, noch für mindestens 40 min auf Eis in 1 ml DTBP-Lösung (10 mM in PBS) inkubiert und anschließend mit 1x PBS gewaschen. Der Zellaufschluß erfolgte dann in frisch hergestelltem IP-Lyse Puffer (komplett), wobei 100 µl Puffer pro 1×10^6 Zellen eingesetzt wurden. Nach einer Inkubation von 15 min auf dem Orbitalschüttler bei 4°C wurden die Extrakte für 20 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Cap überführt, bei -80°C gelagert und stand für anschließende Western Blots oder Immunpräzipitations Experimente zur Verfügung.

5.5.6 Immunopräzipitation

Für die Immunpräzipitations Experimente wurden 300 - 500 µg Gesamtprotein (wie oben beschrieben) eingesetzt. In der Regel wurden die Lysate mit 1x PBS auf ein Gesamtvolumen von 500 µl gebracht und mit je 1 µg des entsprechenden Antikörpers über Nacht bei 4°C auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Für Präzipitationen mit dem murinen, monoklonalen Antikörper gegen den N-Terminus von AF4 wurden jeweils 500 µl des 6E9/5-Überstandes eingesetzt. Anschließend wurden 100 µl Protein A oder Protein G Agarose (bereits in Lösung, Sigma) zugegeben und für weitere 4 h bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Durch kurze (10 sec) Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C wurden die Agarose *beads* gesammelt und noch dreimal mit 1x PBS gewaschen. Zur Auflösung der Kreuzvernetzungen wurden die Präzipitate in Lämmli-Puffer aufgekocht und standen dann für Immunoblot Untersuchungen zur Verfügung.

6 Abkürzungen

%(v/v)	Volumenprozent pro Volumen
%(w/v)	Massenprozent pro Volumen
□-ME	□-Mercaptoethanol
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Amp	Ampicillin
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
AF4	ALL-1 fused gene on chromosome 1
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APOD	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäuren
bcr	Bruchpunksregion
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin
der11	Derivatchromosom 11
der4	Derivatchromosom 4
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate (A, T, G, C)
ds	double stranded (doppelsträngige DNA)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
Gal4-AD	Aktivierungsdomäne des Gal4 Transkriptionsfaktors
Gal4-BD	DNA-bindende Domäne des Gal4 Transkriptionsfaktors
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde

HA	Hämagglutinin
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
M	Molar
Mb	Mega-Basenpaare
MCS	Multiple Cloning Site
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MLL	Mixed lineage leukemia Gen
mM	Millimolar
MTT	(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Molecular Weight (Molekulargewicht)
NLS	Nuclear Localization Signal (Kernlokalisierungssignal)
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte (Absorption)
ORF	Open Reading Frame (Offener Leserahmen)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit)
ÜS	Überstand
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

7 Literaturverzeichnis

- Almond, J. B. and Cohen, G. M. **2002**. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* **16**(4): 433-43.
- Aplan, P. D., Chervinsky, D. S., Stanulla, M. and Burhans, W. C. **1996**. Site-specific DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region induced by topoisomerase II inhibitors. *Blood* **87**(7): 2649-58.
- Ayton, P. M. and Cleary, M. L. **2003**. Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes & Development* **17**(18): 2298-307.
- Bangerter, U. **Dissertation 2001**. Funktionelle Analyse der humanen Fusionsproteine MLL/AF-4 und AF-4/MLL der Translokation t(4;11) in kultivierten Säugerzellen. *Dissertation aus dem Institut für Mikrobiologie, Biochemie und Genetik der Universität Erlangen-Nürnberg*.
- Bartram, C. R., Anger, B., Carbonell, F. and Kleihauer, E. **1985**. Involvement of chromosome 9 in variant Ph1 translocation. *Leukemia Research* **9**(9): 1133-7.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. and Seemüller, E. **1998**. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**(3): 367-80.
- Bertrand, F. E., Spengeman, J. D., Shah, N. and LeBien, T. W. **2003**. B-cell development in the presence of the MLL/AF4 oncoprotein proceeds in the absence of HOX A7 and HOX A9 expression. *Leukemia* **17**(12): 2454-9.
- Bigoni, R., Cuneo, A., Roberti, M. G., Moretti, S., De Angeli, C., Dabusti, M., Campioni, D., del Senno, L., Biondi, A., Chaplin, T., Young, B. D. and Castoldi, G. **1999**. Therapy-related adult acute lymphoblastic leukemia with t(4;11)(q21; q23): MLL rearrangement, p53 mutation and multilineage involvement. *Leukemia* **13**(5): 704-7.
- Boehm, J., He, Y., Greiner, A., Staudt, L. and Wirth, T. **2001**. Regulation of BOB.1/OBF.1 stability by SIAH. *Embo J* **20**(15): 4153-62.
- Bruzzoni-Giovanelli, H., Faille, A., Linares-Cruz, G., Nemani, M., Le Deist, F., Germani, A., Chassoux, D., Millot, G., Roperch, J. P., Amson, R., Telerman, A. and Calvo, F. **1999**. SIAH-1 inhibits cell growth by altering the mitotic process. *Oncogene* **18**(50): 7101-9.
- Bursen, A. **Diplomarbeit 1999**. Untersuchungen zum DNA End-Joining Reparatur-System in leukämischen t(4;11)-Zelllinien. *Diplomarbeit aus dem Institut für Mikrobiologie, Biochemie und Genetik der Universität Erlangen-Nürnberg*.
- Butler, L. H., Slany, R., Cui, X., Cleary, M. L. and Mason, D. Y. **1997**. The HRX proto-oncogene product is widely expressed in human tissues and localizes to nuclear structures. *Blood* **89**(9): 3361-70.
- Carthew, R. W. and Rubin, G. M. **1990**. Seven in absentia, a gene required for specification of R7 cell fate in the Drosophila eye. *Cell* **63**(3): 561-77.
- Caslini, C., Serna, A., Rossi, V., Introna, M. and Biondi, A. **2004**. Modulation of cell cycle by graded expression of MLL-AF4 fusion oncoprotein. *Leukemia* **18**(6): 1064-71.

- Chakrabarti, L., Knight, S. J., Flannery, A. V. and Davies, K. E. **1996**. A candidate gene for mild mental handicap at the FRAXE fragile site. *Hum Mol Genet* **5**(2): 275-82.
- Chen, C. S., Hilden, J. M., Frestedt, J., Domer, P. H., Moore, R., Korsmeyer, S. J. and Kersey, J. H. **1993a**. The chromosome 4q21 gene (AF-4/FEL) is widely expressed in normal tissues and shows breakpoint diversity in t(4;11)(q21;q23) acute leukemia. *Blood* **82**(4): 1080-5.
- Chen, C. S., Sorensen, P. H., Domer, P. H., Reaman, G. H., Korsmeyer, S. J., Heerema, N. A., Hammond, G. D. and Kersey, J. H. **1993b**. Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* **81**(9): 2386-93.
- Ciechanover, A., Orian, A. and Schwartz, A. L. **2000**. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* **22**(5): 442-51.
- Cimino, G., Lanza, C., Elia, L., Lo Coco, F., Gaidano, G., Biondi, A., Pastore, C., Serra, A., Canaani, E., Croce, C. M., Mandelli, F. and Saglio, G. **1997a**. Multigenetic lesions in infant acute leukaemias: correlations with ALL-1 gene status. *Br J Haematol* **96**(2): 308-13.
- Cimino, G., Rapanotti, M. C., Biondi, A., Elia, L., Lo Coco, F., Price, C., Rossi, V., Rivolta, A., Canaani, E., Croce, C. M., Mandelli, F. and Greaves, M. **1997b**. Infant acute leukemias show the same biased distribution of ALL1 gene breaks as topoisomerase II related secondary acute leukemias. *Cancer Research* **57**(14): 2879-83.
- Cohen, A., Grunberger, T., Vanek, W., Dube, I. D., Doherty, P. J., Letarte, M., Roifman, C. and Freedman, M. H. **1991**. Constitutive expression and role in growth regulation of interleukin-1 and multiple cytokine receptors in a biphenotypic leukemic cell line. *Blood* **78**(1): 94-102.
- Corral, J., Lavenir, I., Impey, H., Warren, A. J., Forster, A., Larson, T. A., Bell, S., McKenzie, A. N., King, G. and Rabbitts, T. H. **1996**. An Mll-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell* **85**(6): 853-61.
- DiMartino, J. F., Ayton, P. M. and Cleary, M. L. **1999**. Structure-function analysis of MLL-AF10 and MLL-ELL fusion proteins. *Blood* **94**(ASH meeting abstract 239).
- Djabali, M., Selleri, L., Parry, P., Bower, M., Young, B. D. and Evans, G. A. **1992**. A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukaemias. *Nat Genet* **2**(2): 113-8.
- Dobson, C. L., Warren, A. J., Pannell, R., Forster, A. and Rabbitts, T. H. **2000**. Tumorigenesis in mice with a fusion of the leukaemia oncogene Mll and the bacterial lacZ gene. *EMBO* **19**(5): 843-51.
- Domer, P. H., Fakharzadeh, S. S., Chen, C. S., Jockel, J., Johansen, L., Silverman, G. A., Kersey, J. H. and Korsmeyer, S. J. **1993**. Acute mixed-lineage leukemia t(4;11)(q21;q23) generates an MLL-AF4 fusion product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(16): 7884-8.
- Domer, P. H., Head, D. R., Renganathan, N., Raimondi, S. C., Yang, E. and Atlas, M. **1995**. Molecular analysis of 13 cases of MLL/11q23 secondary acute leukemia and identification of topoisomerase II consensus-binding sequences near the

- chromosomal breakpoint of a secondary leukemia with the t(4;11). *Leukemia* **9**(8): 1305-12.
- Dördelmann, M., Reiter, A., Borkhardt, A., Ludwig, W. D., Gotz, N., Viehmann, S., Gadner, H., Riehm, H. and Schrappe, M. **1999**. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia.[see comment]. *Blood* **94**(4): 1209-17.
- Downing, J. R., Head, D. R., Raimondi, S. C., Carroll, A. J., Curcio-Brint, A. M., Motroni, T. A., Hulshof, M. G., Pullen, D. J. and Domer, P. H. **1994**. The der(11)-encoded MLL/AF-4 fusion transcript is consistently detected in t(4;11)(q21;q23)-containing acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **83**(2): 330-5.
- Ernst, P., Fisher, J. K., Avery, W., Wade, S., Foy, D. and Korsmeyer, S. J. **2004**. Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene. *Developmental Cell* **6**(3): 437-43.
- Fang, S., Jensen, J. P., Ludwig, R. L., Vousden, K. H. and Weissman, A. M. **2000**. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* **275**(12): 8945-51.
- Felix, C. A., Hosler, M. R., Slater, D. J., Megonigal, M. D., Lovett, B. D., Williams, T. M., Nowell, P. C., Spinner, N. B., Owens, N. L., Hoxie, J., Croce, C. M., Lange, B. J. and Rappaport, E. F. **1999**. Duplicated regions of AF-4 intron 4 at t(4;11) translocation breakpoints. *Molecular Diagnosis* **4**(4): 269-83.
- Felix, C. A., Hosler, M. R., Winick, N. J., Masterson, M., Wilson, A. E. and Lange, B. J. **1995**. ALL-1 gene rearrangements in DNA topoisomerase II inhibitor-related leukemia in children. *Blood* **85**(11): 3250-6.
- Fidanza, V., Melotti, P., Yano, T., Nakamura, T., Bradley, A., Canaani, E., Calabretta, B. and Croce, C. M. **1996**. Double knockout of the ALL-1 gene blocks hematopoietic differentiation in vitro. *Cancer Research* **56**(6): 1179-83.
- Fiucci, G., Beaucourt, S., Duflaut, D., Lespagnol, A., Stumptner-Cuvelette, P., Geant, A., Buchwalter, G., Tuynder, M., Susini, L., Lassalle, J. M., Wasylyk, C., Wasylyk, B., Oren, M., Amson, R. and Telerman, A. **2004**. Siah-1b is a direct transcriptional target of p53: identification of the functional p53 responsive element in the siah-1b promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(10): 3510-5.
- Frestedt, J. L., Hilden, J. M., Moore, R. O. and Kersey, J. H. **1996**. Differential expression of AF4/FEL mRNA in human tissues. *Genet Anal* **12**(3-4): 147-9.
- Frew, I. J., Hammond, V. E., Dickins, R. A., Quinn, J. M., Walkley, C. R., Sims, N. A., Schnall, R., Della, N. G., Holloway, A. J., Digby, M. R., Janes, P. W., Tarlinton, D. M., Purton, L. E., Gillespie, M. T. and Bowtell, D. D. **2003**. Generation and analysis of Siah2 mutant mice. *Molecular & Cellular Biology* **23**(24): 9150-61.
- Gale, K. B., Ford, A. M., Repp, R., Borkhardt, A., Keller, C., Eden, O. B. and Greaves, M. F. **1997**. Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 13950-4.
- Garcia, I. S., Kaneko, Y., Gonzalez-Sarmiento, R., Campbell, K., White, L., Boehm, T. and Rabbitts, T. H. **1991**. A study of chromosome 11p13 translocations involving TCR beta and TCR delta in human T cell leukaemia. *Oncogene* **6**(4): 577-82.
- Garcia-Cuellar, M. P., Schreiner, S. A., Birke, M., Hamacher, M., Fey, G. H. and Slany, R. K. **2000**. ENL, the MLL fusion partner in t(11;19), binds to the c-Abl

- interactor protein 1 (ABI1) that is fused to MLL in t(10;11)+. *Oncogene* **19**(14): 1744-51.
- Garcia-Cuellar, M. P., Zilles, O., Schreiner, S. A., Birke, M., Winkler, T. H. and Slany, R. K. **2001**. The ENL moiety of the childhood leukemia-associated MLL-ENL oncoprotein recruits human Polycomb 3. *Oncogene* **20**(4): 411-9.
- Gecz, J., Gedeon, A. K., Sutherland, G. R. and Mulley, J. C. **1996**. Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation. *Nat Genet* **13**(1): 105-8.
- Germani, A., Bruzzoni-Giovanelli, H., Fellous, A., Gisselbrecht, S., Varin-Blank, N. and Calvo, F. **2000**. SIAH-1 interacts with alpha-tubulin and degrades the kinesin Kid by the proteasome pathway during mitosis. *Oncogene* **19**(52): 5997-6006.
- Germani, A., Romero, F., Houlard, M., Camonis, J., Gisselbrecht, S., Fischer, S. and Varin-Blank, N. **1999**. hSiah2 is a new Vav binding protein which inhibits Vav-mediated signaling pathways. *Mol Cell Biol* **19**(5): 3798-807.
- Gillert, E., Leis, T., Repp, R., Reichel, M., Hosch, A., Breitenlohner, I., Angermuller, S., Borkhardt, A., Harbott, J., Lampert, F., Griesinger, F., Greil, J., Fey, G. H. and Marschalek, R. **1999**. A DNA damage repair mechanism is involved in the origin of chromosomal translocations t(4;11) in primary leukemic cells. *Oncogene* **18**(33): 4663-71.
- Gossen, M. and Bujard, H. **1992**. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(12): 5547-51.
- Greil, J., Gramatzki, M., Burger, R., Marschalek, R., Peltner, M., Trautmann, U., Hansen-Hagge, T. E., Bartram, C. R., Fey, G. H. and Stehr, K. **1994**. The acute lymphoblastic leukaemia cell line SEM with t(4;11) chromosomal rearrangement is biphenotypic and responsive to interleukin-7. *Br J Haematol* **86**(2): 275-83.
- Gu, Y., Alder, H., Nakamura, T., Schichman, S. A., Prasad, R., Canaani, O., Saito, H., Croce, C. M. and Canaani, E. **1994**. Sequence analysis of the breakpoint cluster region in the ALL-1 gene involved in acute leukemia. *Cancer Research* **54**(9): 2326-30.
- Gu, Y., Nakamura, T., Alder, H., Prasad, R., Canaani, O., Cimino, G., Croce, C. M. and Canaani, E. **1992**. The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to Drosophila trithorax, to the AF-4 gene. *Cell* **71**(4): 701-8.
- Gu, Y., Shen, Y., Gibbs, R. A. and Nelson, D. L. **1996**. Identification of FMR2, a novel gene associated with the FRAXE CCG repeat and CpG island. *Nat Genet* **13**(1): 109-13.
- Gurney, J. G., Ross, J. A., Wall, D. A., Bleyer, W. A., Severson, R. K. and Robison, L. L. **1997**. Infant cancer in the U.S.: histology-specific incidence and trends, 1973 to 1992. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology* **19**(5): 428-32.
- Harbott, J., Mancini, M., Verellen-Dumoulin, C., Moorman, A. V. and Secker-Walker, L. M. **1998**. Hematological malignancies with a deletion of 11q23: cytogenetic and clinical aspects. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia* **12**(5): 823-7.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S. J. **1993**. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**(4): 805-16.

- Heerema, N. A., Sather, H. N., Ge, J., Arthur, D. C., Hilden, J. M., Trigg, M. E. and Reaman, G. H. **1999**. Cytogenetic studies of infant acute lymphoblastic leukemia: poor prognosis of infants with t(4;11) - a report of the Children's Cancer Group. *Leukemia* **13**(5): 679-86.
- Hemenway, C. S., de Erkenez, A. C. and Gould, G. C. **2001**. The polycomb protein MPc3 interacts with AF9, an MLL fusion partner in t(9;11)(p22;q23) acute leukemias. *Oncogene* **20**(29): 3798-805.
- Hensel, J. P., Gillert, E., Fey, G. H. and Marschalek, R. **2001**. Breakpoints of t(4;11) translocations in the human MLL and AF4 genes in ALL patients are preferentially clustered outside of high-affinity matrix attachment regions. *J Cell Biochem* **82**(2): 299-309.
- Hess, J. L., Yu, B. D., Li, B., Hanson, R. and Korsmeyer, S. J. **1997**. Defects in yolk sac hematopoiesis in Mll-null embryos. *Blood* **90**(5): 1799-806.
- Honda, R., Tanaka, H. and Yasuda, H. **1997**. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Letters* **420**(1): 25-7.
- House, C. M., Frew, I. J., Huang, H. L., Wiche, G., Traficante, N., Nice, E., Catimel, B. and Bowtell, D. D. **2003**. A binding motif for Siah ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(6): 3101-3106.
- Hsieh, J. J., Cheng, E. H. and Korsmeyer, S. J. **2003a**. Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression.[see comment]. *Cell* **115**(3): 293-303.
- Hsieh, J. J., Ernst, P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Korsmeyer, S. J. **2003b**. Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization. *Mol Cell Biol* **23**(1): 186-94.
- Hu, G., Chung, Y. L., Glover, T., Valentine, V., Look, A. T. and Fearon, E. R. **1997a**. Characterization of human homologs of the Drosophila seven in absentia (sina) gene. *Genomics* **46**(1): 103-11.
- Hu, G. and Fearon, E. R. **1999**. Siah-1 N-terminal RING domain is required for proteolysis function, and C-terminal sequences regulate oligomerization and binding to target proteins. *Mol Cell Biol* **19**(1): 724-32.
- Hu, G., Zhang, S., Vidal, M., Baer, J. L., Xu, T. and Fearon, E. R. **1997b**. Mammalian homologs of seven in absentia regulate DCC via the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* **11**(20): 2701-14.
- Isaacs, A. M., Oliver, P. L., Jones, E. L., Jeans, A., Potter, A., Hovik, B. H., Nolan, P. M., Vizer, L., Glenister, P., Simon, A. K., Gray, I. C., Spurr, N. K., Brown, S. D., Hunter, A. J. and Davies, K. E. **2003**. A mutation in Af4 is predicted to cause cerebellar ataxia and cataracts in the robotic mouse. *J Neurosci* **23**(5): 1631-7.
- Isnard, P., Core, N., Naquet, P. and Djabali, M. **2000**. Altered lymphoid development in mice deficient for the mAF4 proto-oncogene. *Blood* **96**(2): 705-10.
- James, P., Halladay, J. and Craig, E. A. **1996**. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**(4): 1425-36.
- Janssen, J. W., Ludwig, W. D., Borkhardt, A., Spadinger, U., Rieder, H., Fonatsch, C., Hossfeld, D. K., Harbott, J., Schulz, A. S. and Repp, R. **1994**. Pre-pre-B acute lymphoblastic leukemia: high frequency of alternatively spliced ALL1-AF4

- transcripts and absence of minimal residual disease during complete remission. *Blood* **84**(11): 3835-42.
- Johansson, B., Mertens, F. and Mitelman, F. **1996**. Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities--balanced rearrangements vs. genomic imbalances? *Genes, Chromosomes & Cancer* **16**(3): 155-63.
- Johansson, B., Moorman, A. V., Haas, O. A., Watmore, A. E., Cheung, K. L., Swanton, S. and Secker-Walker, L. M. **1998**. Hematologic malignancies with t(4;11)(q21;q23)--a cytogenetic, morphologic, immunophenotypic and clinical study of 183 cases. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia* **12**(5): 779-87.
- Johnsen, S. A., Subramaniam, M., Monroe, D. G., Janknecht, R. and Spelsberg, T. C. **2002**. Modulation of transforming growth factor beta (TGFbeta)/Smad transcriptional responses through targeted degradation of TGFbeta-inducible early gene-1 by human seven in absentia homologue. *J Biol Chem* **277**(34): 30754-9.
- Kersey, J. H. **1997**. Fifty years of studies of the biology and therapy of childhood leukemia. *Blood* **90**(11): 4243-51.
- Kuzin, B., Tillib, S., Sedkov, Y., Mizrokhi, L. and Mazo, A. **1994**. The *Drosophila* trithorax gene encodes a chromosomal protein and directly regulates the region-specific homeotic gene fork head. *Genes & Development* **8**(20): 2478-90.
- Lange, B., Valtieri, M., Santoli, D., Caracciolo, D., Mavilio, F., Gemperlein, I., Griffin, C., Emanuel, B., Finan, J. and Nowell, P. **1987**. Growth factor requirements of childhood acute leukemia: establishment of GM-CSF-dependent cell lines. *Blood* **70**(1): 192-9.
- Langer, T., Metzler, M., Reinhardt, D., Viehmann, S., Borkhardt, A., Reichel, M., Stanulla, M., Schrappe, M., Creutzig, U., Ritter, J., Leis, T., Jacobs, U., Harbott, J., Beck, J. D., Rascher, W. and Repp, R. **2003**. Analysis of t(9;11) chromosomal breakpoint sequences in childhood acute leukemia: almost identical MLL breakpoints in therapy-related AML after treatment without etoposides. *Genes, Chromosomes & Cancer* **36**(4): 393-401.
- Lavau, C. **2004**. Advantages and pitfalls of the retroviral transduction/transplantation model to study MLL leukaemias. *Molecular Pathogenesis and Aetiology of Childhood Leukemia*. **Vortrag**.
- Lavau, C., Du, C., Thirman, M. and Zeleznik-Le, N. **2000a**. Chromatin-related properties of CBP fused to MLL generate a myelodysplastic-like syndrome that evolves into myeloid leukemia. *EMBO* **19**(17): 4655-64.
- Lavau, C., Luo, R. T., Du, C. and Thirman, M. J. **2000b**. Retrovirus-mediated gene transfer of MLL-ELL transforms primary myeloid progenitors and causes acute myeloid leukemias in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(20): 10984-9.
- Lavau, C., Szilvassy, S. J., Slany, R. and Cleary, M. L. **1997**. Immortalization and leukemic transformation of a myelomonocytic precursor by retrovirally transduced HRX-ENL. *EMBO* **16**(14): 4226-37.
- Li, S., Li, Y., Carthew, R. W. and Lai, Z. C. **1997**. Photoreceptor cell differentiation requires regulated proteolysis of the transcriptional repressor Tramtrack. *Cell* **90**(3): 469-78.
- Liani, E., Eyal, A., Avraham, E., Shemer, R., Szargel, R., Berg, D., Bornemann, A., Riess, O., Ross, C. A., Rott, R. and Engelender, S. **2004**. Ubiquitylation of synphilin-1 and alpha-synuclein by SIAH and its presence in cellular inclusions and Lewy

- bodies imply a role in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(15): 5500-5.
- Liu, J., Stevens, J., Rote, C. A., Yost, H. J., Hu, Y., Neufeld, K. L., White, R. L. and Matsunami, N. **2001**. Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell* **7**(5): 927-36.
- Look, A. T. **1997**. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* **278**(5340): 1059-64.
- Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S. and Weissman, A. M. **1999**. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 11364-9.
- Ma, C. and Staudt, L. M. **1996**. LAF-4 encodes a lymphoid nuclear protein with transactivation potential that is homologous to AF-4, the gene fused to MLL in t(4;11) leukemias. *Blood* **87**(2): 734-45.
- Ma, Q., Alder, H., Nelson, K. K., Chatterjee, D., Gu, Y., Nakamura, T., Canaani, E., Croce, C. M., Siracusa, L. D. and Buchberg, A. M. **1993**. Analysis of the murine All-1 gene reveals conserved domains with human ALL-1 and identifies a motif shared with DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13): 6350-4.
- Mahgoub, N., Parker, R. I., Hosler, M. R., Close, P., Winick, N. J., Masterson, M., Shannon, K. M. and Felix, C. A. **1998**. RAS mutations in pediatric leukemias with MLL gene rearrangements. *Genes, Chromosomes & Cancer* **21**(3): 270-5.
- Marschalek, R., Greil, J., Lochner, K., Nilson, I., Siegler, G., Zweckbronner, I., Beck, J. D. and Fey, G. H. **1995**. Molecular analysis of the chromosomal breakpoint and fusion transcripts in the acute lymphoblastic SEM cell line with chromosomal translocation t(4;11). *Br J Haematol* **90**(2): 308-20.
- Marschalek, R., Nilson, I., Lochner, K., Greim, R., Siegler, G., Greil, J., Beck, J. D. and Fey, G. H. **1997**. The structure of the human ALL-1/MLL/HRX gene. *Leuk Lymphoma* **27**(5-6): 417-28.
- Martin, M. E., Milne, T. A., Bloyer, S., Galoian, K., Shen, W., Gibbs, D., Brock, H. W., Slany, R. and Hess, J. L. **2003**. Dimerization of MLL fusion proteins immortalizes hematopoietic cells. *Cancer Cell* **4**(3): 197-207.
- Matsuzawa, S., Takayama, S., Froesch, B. A., Zapata, J. M. and Reed, J. C. **1998**. p53-inducible human homologue of Drosophila seven in absentia (Siah) inhibits cell growth: suppression by BAG-1. *EMBO* **17**(10): 2736-47.
- Matsuzawa, S. I. and Reed, J. C. **2001**. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell* **7**(5): 915-26.
- Meyer, C., Schneider, B., Reichel, M., Angermüller, S., Schnittger, S., Schoch, C., Jansen, M. W. J. C., van Dongen, J. J. M., Pieters, R., Haas, O. A., Strehl, S., Dingermann, T., Klingebiel, T. and Marschalek, R. **2004**. Analyzing the recombinome of the MLL gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **submitted**.
- Moritz, S. **Diplomarbeit 2002**. Erzeugung eines monoklonalen Antikörpers gegen den AF4 N-Terminus und Untersuchung der transformierenden Eigenschaften des AF4 Proteins. *Diplomarbeit aus dem Institut für Mikrobiologie, Biochemie und Genetik der Universität Erlangen-Nürnberg*.

- Morrissey, J. J., Raney, S. and Cleary, M. L. **1997**. The FEL (AF-4) protein donates transcriptional activation sequences to Hrx-Fel fusion proteins in leukemias containing T(4;11)(Q21;Q23) chromosomal translocations. *Leuk Res* **21**(10): 911-7.
- Nakamura, T., Alder, H., Gu, Y., Prasad, R., Canaani, O., Kamada, N., Gale, R. P., Lange, B., Crist, W. M. and Nowell, P. C. **1993**. Genes on chromosomes 4, 9, and 19 involved in 11q23 abnormalities in acute leukemia share sequence homology and/or common motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(10): 4631-5.
- Nakamura, T., Mori, T., Tada, S., Krajewski, W., Rozovskaia, T., Wassell, R., Dubois, G., Mazo, A., Croce, C. M. and Canaani, E. **2002**. ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* **10**(5): 1119-28.
- Nilson, I., Lochner, K., Siegler, G., Greil, J., Beck, J. D., Fey, G. H. and Marschalek, R. **1996**. Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukaemias. *Br J Haematol* **93**(4): 966-72.
- Nilson, I., Reichel, M., Ennas, M. G., Greim, R., Knorr, C., Siegler, G., Greil, J., Fey, G. H. and Marschalek, R. **1997**. Exon/intron structure of the human AF-4 gene, a member of the AF-4/LAF-4/FMR-2 gene family coding for a nuclear protein with structural alterations in acute leukaemia. *Br J Haematol* **98**(1): 157-69.
- Paro, R. **1993**. Mechanisms of heritable gene repression during development of *Drosophila*. *Current Opinion in Cell Biology* **5**(6): 999-1005.
- Prasad, R., Yano, T., Sorio, C., Nakamura, T., Rallapalli, R., Gu, Y., Leshkowitz, D., Croce, C. M. and Canaani, E. **1995**. Domains with transcriptional regulatory activity within the ALL1 and AF4 proteins involved in acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(26): 12160-4.
- Pui, C. H. **2000**. Acute lymphoblastic leukemia in children. *Current Opinion in Oncology* **12**(1): 3-12.
- Pui, C. H., Frankel, L. S., Carroll, A. J., Raimondi, S. C., Shuster, J. J., Head, D. R., Crist, W. M., Land, V. J., Pullen, D. J. and Steuber, C. P. **1991**. Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11)(q21;q23): a collaborative study of 40 cases.[see comment]. *Blood* **77**(3): 440-7.
- Rabbitts, T. H. **1994**. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* **372**(6502): 143-9.
- Rabbitts, T. H. **1999**. Perspective: chromosomal translocations can affect genes controlling gene expression and differentiation--why are these functions targeted? *Journal of Pathology* **187**(1): 39-42.
- Reaman, G. H., Sposto, R., Sensel, M. G., Lange, B. J., Feusner, J. H., Heerema, N. A., Leonard, M., Holmes, E. J., Sather, H. N., Pendergrass, T. W., Johnstone, H. S., O'Brien, R. T., Steinherz, P. G., Zeltzer, P. M., Gaynon, P. S., Trigg, M. E. and Uckun, F. M. **1999**. Treatment outcome and prognostic factors for infants with acute lymphoblastic leukemia treated on two consecutive trials of the Children's Cancer Group.[see comment]. *Journal of Clinical Oncology* **17**(2): 445-55.
- Reichel, M. **Dissertation 2000**. Untersuchung von Fusionsstellen in primärem Biopsiematerial von Leukämiepatienten mit Translokation t(4;11). *Dissertation aus*

dem Institut für Mikrobiologie, Biochemie und Genetik der Universität Erlangen-Nürnberg.

- Reichel, M., Gillert, E., Angermüller, S., Hensel, J. P., Heidel, F., Lode, M., Leis, T., Biondi, A., Haas, O. A., Strehl, S., Panzer-Grumayer, E. R., Griesinger, F., Beck, J. D., Greil, J., Fey, G. H., Uckun, F. M. and Marschalek, R. **2001**. Biased distribution of chromosomal breakpoints involving the MLL gene in infants versus children and adults with t(4;11) ALL. *Oncogene* **20**(23): 2900-7.
- Reichel, M., Gillert, E., Breitenlohner, I., Repp, R., Greil, J., Beck, J. D., Fey, G. H. and Marschalek, R. **1999**. Rapid isolation of chromosomal breakpoints from patients with t(4;11) acute lymphoblastic leukemia: implications for basic and clinical research. *Cancer Research* **59**(14): 3357-62.
- Reichel, M., Gillert, E., Nilson, I., Siegler, G., Greil, J., Fey, G. H. and Marschalek, R. **1998**. Fine structure of translocation breakpoints in leukemic blasts with chromosomal translocation t(4;11): the DNA damage-repair model of translocation. *Oncogene* **17**(23): 3035-44.
- Relaix, F., Wei, X., Li, W., Pan, J., Lin, Y., Bowtell, D. D., Sassoon, D. A. and Wu, X. **2000**. Pw1/Peg3 is a potential cell death mediator and cooperates with Siah1a in p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(5): 2105-10.
- Richardson, C. and Jasin, M. **2000**. Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature* **405**(6787): 697-700.
- Roperch, J. P., Lethrone, F., Prieur, S., Piouffre, L., Israeli, D., Tuynder, M., Nemani, M., Pastraud, P., Gendron, M. C., Dausset, J., Oren, M., Amson, R. B. and Telerman, A. **1999**. SIAH-1 promotes apoptosis and tumor suppression through a network involving the regulation of protein folding, unfolding, and trafficking: identification of common effectors with p53 and p21(Waf1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14): 8070-3.
- Ross, J. A. **1998**. Maternal diet and infant leukemia: a role for DNA topoisomerase II inhibitors? *International Journal of Cancer - Supplement* **11**: 26-8.
- Ross, J. A. **2000**. Dietary flavonoids and the MLL gene: A pathway to infant leukemia?[comment]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4411-3.
- Roth, D. B., Chang, X. B. and Wilson, J. H. **1989**. Comparison of filler DNA at immune, nonimmune, and oncogenic rearrangements suggests multiple mechanisms of formation. *Mol Cell Biol* **9**(7): 3049-57.
- Roth, D. B., Porter, T. N. and Wilson, J. H. **1985**. Mechanisms of nonhomologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **5**(10): 2599-607.
- Roth, D. B. and Wilson, J. H. **1986**. Nonhomologous recombination in mammalian cells: role for short sequence homologies in the joining reaction. *Mol Cell Biol* **6**(12): 4295-304.
- Rowley, J. D. **1973**. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**(5405): 290-3.
- Rowley, J. D. **1992**. The der(11) chromosome contains the critical breakpoint junction in the 4;11, 9;11, and 11;19 translocations in acute leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer* **5**(3): 264-6.

- Rowley, J. D. **1998**. The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annual Review of Genetics* **32**: 495-519.
- Rowley, J. D., Diaz, M. O., Espinosa, R., III, Patel, Y. D., van Melle, E., Ziemin, S., Taillon-Miller, P., Lichter, P., Evans, G. A. and Kersey, J. H. **1990**. Mapping chromosome band 11q23 in human acute leukemia with biotinylated probes: identification of 11q23 translocation breakpoints with a yeast artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(23): 9358-62.
- Rozenblatt-Rosen, O., Rozovskaia, T., Burakov, D., Sedkov, Y., Tillib, S., Blechman, J., Nakamura, T., Croce, C. M., Mazo, A. and Canaani, E. **1998**. The C-terminal SET domains of ALL-1 and TRITHORAX interact with the INI1 and SNR1 proteins, components of the SWI/SNF complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(8): 4152-7.
- Rozovskaia, T., Tillib, S., Smith, S., Sedkov, Y., Rozenblatt-Rosen, O., Petruk, S., Yano, T., Nakamura, T., Ben-Simchon, L., Gildea, J., Croce, C. M., Shearn, A., Canaani, E. and Mazo, A. **1999**. Trithorax and ASH1 interact directly and associate with the trithorax group-responsive bxd region of the Ultrabithorax promoter. *Mol Cell Biol* **19**(9): 6441-7.
- Rubnitz, J. E., Behm, F. G. and Downing, J. R. **1996**. 11q23 rearrangements in acute leukemia. *Leukemia* **10**(1): 74-82.
- Sanchez-Garcia, I. **1997**. Consequences of chromosomal abnormalities in tumor development. *Annual Review of Genetics* **31**: 429-53.
- Sanchez-Garcia, I. and Rabbitts, T. H. **1993**. LIM domain proteins in leukaemia and development. *Seminars in Cancer Biology* **4**(6): 349-58.
- Shinobu, N., Maeda, T., Aso, T., Ito, T., Kondo, T., Koike, K. and Hatakeyama, M. **1999**. Physical interaction and functional antagonism between the RNA polymerase II elongation factor ELL and p53. *J Biol Chem* **274**(24): 17003-10.
- Simone, F., Polak, P. E., Kaberlein, J. J., Luo, R. T., Levitan, D. A. and Thirman, M. J. **2001**. EAF1, a novel ELL-associated factor that is delocalized by expression of the MLL-ELL fusion protein. *Blood* **98**(1): 201-9.
- Slany, R. K., Lavau, C. and Cleary, M. L. **1998**. The oncogenic capacity of HRX-ENL requires the transcriptional transactivation activity of ENL and the DNA binding motifs of HRX. *Mol Cell Biol* **18**(1): 122-9.
- So, C. W. and Cleary, M. L. **2003**. Common mechanism for oncogenic activation of MLL by forkhead family proteins. *Blood* **101**(2): 633-9.
- So, C. W., Lin, M., Ayton, P. M., Chen, E. H. and Cleary, M. L. **2003**. Dimerization contributes to oncogenic activation of MLL chimeras in acute leukemias. *Cancer Cell* **4**(2): 99-110.
- Stanulla, M., Wang, J., Chervinsky, D. S., Thandla, S. and Aplan, P. D. **1997**. DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region is a specific event which occurs as part of higher-order chromatin fragmentation during the initial stages of apoptosis. *Molecular & Cellular Biology* **17**(7): 4070-9.
- Strehl, S., Borkhardt, A., Slany, R., Fuchs, U. E., König, M. and Haas, O. A. **2003**. The human LASP1 gene is fused to MLL in an acute myeloid leukemia with t(11;17)(q23;q21). *Oncogene* **22**(1): 157-60.

- Strick, R., Strissel, P. L., Borgers, S., Smith, S. L. and Rowley, J. D. **2000**. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia.[see comment]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(9): 4790-5.
- Strissel, P. L., Espinosa, R., III, Rowley, J. D. and Swift, H. **1996**. Scaffold attachment regions in centromere-associated DNA. *Chromosoma* **105**(2): 122-33.
- Strout, M. P., Marcucci, G., Bloomfield, C. D. and Caligiuri, M. A. **1998**. The partial tandem duplication of ALL1 (MLL) is consistently generated by Alu-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2390-5.
- Susini, L., Passer, B. J., Amzallag-Elbaz, N., Juven-Gershon, T., Prieur, S., Privat, N., Tuynder, M., Gendron, M. C., Israel, A., Amson, R., Oren, M. and Telerman, A. **2001**. Siah-1 binds and regulates the function of Numb. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26): 15067-72.
- Taki, T., Kano, H., Taniwaki, M., Sako, M., Yanagisawa, M. and Hayashi, Y. **1999**. AF5q31, a newly identified AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leukemia with ins(5;11)(q31;q13q23). *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14535-40.
- Tang, A. H., Neufeld, T. P., Kwan, E. and Rubin, G. M. **1997**. PHYL acts to down-regulate TTK88, a transcriptional repressor of neuronal cell fates, by a SINA-dependent mechanism. *Cell* **90**(3): 459-67.
- Tang, A. H., Neufeld, T. P., Rubin, G. M. and Müller, H. A. **2001**. Transcriptional regulation of cytoskeletal functions and segmentation by a novel maternal pair-rule gene, lilliputian. *Development* **128**(5): 801-13.
- Tanikawa, J., Ichikawa-Iwata, E., Kanei-Ishii, C., Nakai, A., Matsuzawa, S., Reed, J. C. and Ishii, S. **2000**. p53 suppresses the c-Myb-induced activation of heat shock transcription factor 3. *J Biol Chem* **275**(20): 15578-85.
- Teyssier, J. R., Bartram, C. R., Deville, J., Potron, G. and Pigeon, F. **1985**. c-abl Oncogene and chromosome 22 "bcr" juxtaposition in chronic myelogenous leukemia. *New England Journal of Medicine* **312**(21): 1393-4.
- Thirman, M. J., Gill, H. J., Burnett, R. C., Mbangkollo, D., McCabe, N. R., Kobayashi, H., Ziemer-van der Poel, S., Kaneko, Y., Morgan, R. and Sandberg, A. A. **1993**. Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations.[see comment]. *New England Journal of Medicine* **329**(13): 909-14.
- Tiedt, R., Bartholdy, B. A., Matthias, G., Newell, J. W. and Matthias, P. **2001**. The RING finger protein Siah-1 regulates the level of the transcriptional coactivator OBF-1. *EMBO* **20**(15): 4143-52.
- Tillib, S., Petruk, S., Sedkov, Y., Kuzin, A., Fujioka, M., Goto, T. and Mazo, A. **1999**. Trithorax- and Polycomb-group response elements within an Ultrabithorax transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences. *Mol Cell Biol* **19**(7): 5189-202.
- Tkachuk, D. C., Kohler, S. and Cleary, M. L. **1992**. Involvement of a homolog of *Drosophila* trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. *Cell* **71**(4): 691-700.
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G. and Reuter, G. **1994**. The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene

- Su(var)3-9 combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO* **13**(16): 3822-31.
- Tuynder, M., Susini, L., Prieur, S., Besse, S., Fiucci, G., Amson, R. and Telerman, A. **2002**. Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(23): 14976-81.
- Van den Berghe, H., David, G., Broeckeaert-Van Orshoven, A., Louwagie, A., Verwilghen, R., Casteels-Van Daele, M., Eggermont, E. and Eeckels, R. **1979**. A new chromosome anomaly in acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Hum Genet* **46**(2): 173-180.
- von Bergh, A. R., Beverloo, H. B., Rombout, P., van Wering, E. R., van Weel, M. H., Beverstock, G. C., Kluin, P. M., Slater, R. M. and Schuurin, E. **2002**. LAF4, an AF4-related gene, is fused to MLL in infant acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer* **35**(1): 92-6.
- Werner, M. **Diplomarbeit 1999**. Kartierung und Sequenzierung bislang unbekannter Regionen des AF4-Gens auf PAC-Klonen. *Diplomarbeit aus dem Institut für Mikrobiologie, Biochemie und Genetik der Universität Erlangen-Nürnberg*.
- Wheeler, T. C., Chin, L. S., Li, Y., Roudabush, F. L. and Li, L. **2002**. Regulation of synaptophysin degradation by mammalian homologues of seven in absentia. *J Biol Chem* **277**(12): 10273-82.
- Wiedemann, L. M., MacGregor, A. and Caldas, C. **1999**. Analysis of the region of the 5' end of the MLL gene involved in genomic duplication events. *British Journal of Haematology* **105**(1): 256-64.
- Wittwer, F., van der Straten, A., Keleman, K., Dickson, B. J. and Hafen, E. **2001**. Lilliputian: an AF4/FMR2-related protein that controls cell identity and cell growth. *Development* **128**(5): 791-800.
- Yano, T., Nakamura, T., Blechman, J., Sorio, C., Dang, C. V., Geiger, B. and Canaani, E. **1997**. Nuclear punctate distribution of ALL-1 is conferred by distinct elements at the N terminus of the protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14): 7286-91.
- Yokoyama, A., Kitabayashi, I., Ayton, P. M., Cleary, M. L. and Ohki, M. **2002**. Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties. *Blood* **100**(10): 3710-8.
- Yu, B. D., Hanson, R. D., Hess, J. L., Horning, S. E. and Korsmeyer, S. J. **1998**. MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(18): 10632-6.
- Yu, B. D., Hess, J. L., Horning, S. E., Brown, G. A. and Korsmeyer, S. J. **1995**. Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* **378**(6556): 505-8.
- Zeisig, B. B., Milne, T., Garcia-Cuellar, M. P., Schreiner, S., Martin, M. E., Fuchs, U. E., Borkhardt, A., Chanda, S. K., Walker, J., Soden, R., Hess, J. L. and Slany, R. **2004**. Hoxa9 and Meis1 Are Key Targets for MLL-ENL-Mediated Cellular Immortalization. *Mol Cell Biol* **24**(2): 617-628.
- Zeisig, B. B., Schreiner, S., Garcia-Cuellar, M. P. and Slany, R. K. **2003**. Transcriptional activation is a key function encoded by MLL fusion partners. *Leukemia* **17**(2): 359-65.

- Zeleznik-Le, N. J., Harden, A. M. and Rowley, J. D. **1994**. 11q23 translocations split the "AT-hook" cruciform DNA-binding region and the transcriptional repression domain from the activation domain of the mixed-lineage leukemia (MLL) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(22): 10610-4.
- Zhang, J., Guenther, M. G., Carthew, R. W. and Lazar, M. A. **1998**. Proteasomal regulation of nuclear receptor corepressor-mediated repression. *Genes & Development* **12**(12): 1775-80.
- Ziemin van der Poel, S., McCabe, N. R., Gill, H. J., Espinosa, R., III, Patel, Y., Harden, A., Rubinelli, P., Smith, S. D., LeBeau, M. M., Rowley, J. D. and Diaz, M. O. **1991**. Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(23): 10735-9.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Adelheid Ariane Bursen
Geboren am: 08.01.1973 in Mediasch/Rumänien
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

09/1979 - 07/1983 Grundschule (Allgemeinschule Baaßen)
09/1983 - 12/1983 Volksschule (Baaßen), 1. Dritteljahr (Trimester)
19.12.1983 Aussiedlung in die Bundesrepublik Deutschland
01/1984 - 07/1984 Volksschule Fürth, Soldnerstraße (Hauptschule)
09/1984 - 07/1993 Helene-Lange-Gymnasium, Gesamtschule Fürth (Bay)
Abschluss: Abitur

Studium:

11/1993 - 10/1999 Studium der Biologie an der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg
06/1996 Diplomvorprüfung (Biologie, Chemie, Physik)
Beginn des Hauptstudiums (Hauptfach: Genetik, biologische Nebenfächer: Biochemie und Zoologie, nicht-biologisches Nebenfach: Rechtsmedizin)
10/1998 Diplomprüfung Genetik
11/1998 Diplomprüfung Biochemie
11/1998 Diplomprüfung Zoologie
11/1998 Diplomprüfung Rechtsmedizin
01/1999 - 10/1999 Diplomarbeit an der FAU Erlangen-Nürnberg, Institut für Mikrobiologie, Biochemie und Genetik, Lehrstuhl für Genetik, "*Untersuchungen zum DNA End-Joining Reparatur-System in leukämischen t(4;11) Zelllinien*" unter Anleitung von PD Dr. Rolf Marschalek, bei Prof. Dr. Georg Fey
10/1999 Erlangen des akademischen Grades Diplom-Biologin
01/2000 Promotion an der FAU Erlangen-Nürnberg, Institut für Mikrobiologie, Biochemie und Genetik, Lehrstuhl für Genetik (PD Dr. Rolf Marschalek)
07/2000 Fortführung der Promotion am Institut für Pharmazeutische Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main unter der Leitung von Prof. Dr. Rolf Marschalek

Akademische Lehrer

Prof. Dr. Marschalek, Prof. Dr. Fey, Prof. Dr. Schweizer, Prof. Dr. Seitz, Prof. Dr. Lötterle, Prof. Dr. Nezadal, PD Dr. Gansloßer und Prof. Dr. Dingermann

Publikationen

Interaction of AF4 wild-type and AF4•MLL fusion protein with SIAH proteins: indication for t(4;11) pathobiology?

Adelheid Bursen, Sven Moritz, Anne Gaußmann, Sören Moritz, Theo Dingermann und Rolf Marschalek

Onkogene, 2004, 1-13 *online publication and in press.*

Multidimensional gas chromatography - mass spectrometry for tracer studies of fatty acid metabolism via stable isotopes in cultured human trophoblast cells

Alexandra Muth, Armin Mosandl, Adelheid Bursen, Rolf Marschalek, Adrian C. Sewell, Hans Böhles

Journal of Chromatography B, 2003, 235-244.

Vorträge und Poster-Präsentationen

Interaction of AF4 wild-type and AF4•MLL fusion protein with SIAH proteins: indication for t(4;11) pathobiology?

Posterbeitrag auf dem 4th Biennial Hannover Symposium on Childhood Leukemia in Celle, Mai 2004

1. Preis des Hannover Leukemia Research Prize 2004

Molecular interactions of the human AF4 protein: towards a functional understanding of t(4;11) translocations

Vortrag auf der Jahrestagung der Kind-Philipp Stiftung für Leukämieforschung in Wilsede, Juni 2002

Molecular interactions of the human AF4 protein: towards a functional understanding of acute lymphoblastic leukemia carrying a t(4;11) translocation

Posterbeitrag auf dem DPHG - 4th European Graduate Student Meeting in Frankfurt/Main, Februar 2002

The AF4•MLL fusion protein and the proto-oncoprotein AF4 confers growth transforming potential in stably transfected murine fibroblasts

Vortrag auf der Jahrestagung der Kind-Philipp Stiftung für Leukämieforschung in Wilsede, Juni 2001

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Rolf Marschalek für die Überlassung des sehr interessanten Themas, seine engagierte Betreuung, viele anregende Diskussionen, die Durchsicht der Arbeit und insbesondere für das freundschaftliche Verhältnis während der letzten Jahre.

Prof. Dr. Theodor Dingermann danke ich für die anhaltende Diskussionsbereitschaft bei den vielen Vorträgen im Arbeitsseminar und die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung.

Prof. Dr. Georg Fey, Dr. Esther Gillert und Sören Moritz danke ich für die freundliche Überlassung der Hybridoma-Zelllinie 6E95.

Dr. T. Nakamura und Dr. E. Canaani (Philadelphia, USA) danke ich für die freundliche Überlassung des Antikörpers 173.

Dr. Ilse Zündorf und HD Dr. Thomas Winckler danke ich für die große Hilfsbereitschaft und die kritischen und kreativen Diskussionsbeiträge bei den Arbeitsseminaren. Natürlich danke ich Thomas auch für den wesentlichen Beitrag dazu, dass ich zum Mac-User wurde.

Allen früheren und jetzigen Mitgliedern der "Leukämiegruppe" danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit. Jürgen Zech, Dr. Dorothe Schraets und insbesondere Sven Moritz, mit denen ich so lange Zeit an der "Bench" stand, danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre, die vielen Gespräche und die Nachsicht, die sie mir an schlechten Tagen entgegenbrachten. Sebastian Scharf, Björn Schneider, Clarissa Oehm und Sabine vielen Dank für den frischen Wind.

Ganz herzlicher Dank gilt:

Anne Gaußmann für eine tolle Freundschaft und einfach für Alles. – Eine komplette Auflistung all dessen, wofür ich Dir danke, würde den Rahmen dieser Seite sprengen.

Claus Meyer für das tolle "Zusammenspiel" innerhalb und außerhalb des Labors, wobei das Abspiel des FUS(balls) leider nicht erfolgreich war (sorry!).

Monika Baik für die selbstverständliche Unterstützung während größerer und kleinerer Notlagen und dafür, dass Sie nicht müde wird, mir immer wieder aufzuzeigen, dass man "Dinge" auch anders sehen kann.

Allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Biologie sei für das freundliche Arbeitsklima gedankt. Insbesondere Dr. Peter Beck, Dr. Christian Klein, Dr. Anke Friese, Ute Steiner, Oliver Siol, Ingo Jennes und Thanh Chung danke ich für den wissenschaftlichen Austausch und die unterhaltsamen Kaffeepausen. Herzlich danke ich auch Fr. Lemmer und natürlich den TAs Christina Tschepke, Christin Utner, Julia Boße und Jens Rabenstein, die ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dr. Heidi Lingnau danke ich für die anhaltende Freundschaft trotz widriger Umstände und seltener Telefongespräche.

Meiner Mami und Reini danke ich für ihr Vertrauen und für das Verständnis und die Unterstützung, die sie mir und meiner Arbeit während der letzten Jahre entgegengebracht haben. Meiner ganzen Familie, insbesondere Steffi und Tina, und meinen Freunden danke ich für die Geduld und die Nachsicht, die sie mit mir hatten.

Insbesondere gilt mein Dank Dr. Sven Asche für die schöne Zeit, die wir bisher miteinander verbringen durften. Für das unendliche Verständnis und die Nachsicht, die er mir und meiner Arbeit entgegengebracht hat und für die Kraft und Unterstützung, mit deren Hilfe ich manchen "Durchhänger" in den letzten Jahren überwinden konnte.

Allen Kollegen und Menschen außerhalb des Labors, denen ich dankbar bin und die ich hier nicht erwähnt habe, wünsche ich die Größe, mir diesen Fehler nachzusehen.

