

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller  
des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg



**Regulation der *FOXO*-Gene durch E2F-1  
und  
die induzierbare systemische Rekombination  
eines konditionellen Allels in der Maus**

**Inaugural –Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Christine Ruth Geßner aus Marburg

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am

05.11.2009

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Rothmund  
Referent: Prof. Dr. Eilers  
Korreferent: Prof. Dr. Heidtmann

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Krebs - eine Krankheit des Genoms.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2.</b>	<b>Der Zellzyklus und die Rb/E2F Interaktion.....</b>	<b>3</b>
1.2.1	Die E2F-Familie.....	6
1.2.2	E2F-1 induzierte Apoptose.....	8
<b>1.3</b>	<b>FoxO Transkriptionsfaktoren als Zielgene von E2F-1.....</b>	<b>10</b>
1.3.1	Die FoxO Familie der Forkhead Transkriptionsfaktoren.....	10
1.3.2	Posttranslationelle Regulation der FoxO-Proteine.....	12
1.3.3	Die Funktionen von FoxO im Organismus.....	14
<b>1.4</b>	<b>Das Neuroblastom.....</b>	<b>18</b>
<b>1.5</b>	<b>Fragestellung und Ziel der Arbeit:</b>	
	<b>Regulation der FOXO-Gene durch E2F-1.....</b>	<b>20</b>
<b>1.6</b>	<b>Die induzierbare systemische Rekombination</b>	
	<b>eines konditionellen Allels in der Maus.....</b>	<b>20</b>
1.6.1	Der Einsatz konditioneller versus konventioneller Mausmodelle.....	20
1.6.2	Die Tamoxifen induzierbare Cre-Rekombinase.....	22
1.6.3	Pharmakokinetik und -dynamik von Tamoxifen.....	23
<b>1.7</b>	<b>Die Aktivierung eines mutierten Gens (<math>p300^{ASneo}</math>) durch</b>	
	<b>die Tamoxifen induzierbare Cre-Rekombinase in der Maus.....</b>	<b>23</b>
1.7.1	Die Acetyltransferase p300 - ein potentieller Tumorsuppressor.....	23
1.7.2	Die induzierbare systemische Derepression des $p300^{AS}$ -Allels.....	24
1.7.3	Ziel der Arbeit: Die induzierbare systemische Rekombination	
	eines konditionellen Allels in der Maus.....	26
<b>2</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien.....</b>	<b>27</b>

<b>2.2 Zellkultur.....</b>	<b>27</b>
2.2.1 Vollmedien.....	27
2.2.2 Einfriermedium.....	27
2.2.3 Trypsin-EDTA.....	27
2.2.4 Selektionsantibiotikum.....	27
2.2.5 PBS (Phosphat Buffered Saline).....	27
2.2.6 Zelllinien.....	28
2.2.7 4-Hydroxy-Tamoxifen.....	28
2.2.8 Zellkulturschalen.....	28
2.2.9 Inkubator.....	28
2.2.10 Sterile Arbeitsbank.....	28
<b>2.3 Transfektionen und Luciferase- Reporter- Assays.....</b>	<b>28</b>
2.3.1 Opti-MEM.....	28
2.3.2 Lipofectin Transfection Reagent.....	28
2.3.3 Plasmide.....	28
2.3.4 Transiente Assays.....	30
<b>2.4 Herstellung von Präparaten zur Fluoreszenzmikroskopie von GFP-Proteinen.....</b>	<b>31</b>
<b>2.5 Analyse der Genexpression auf RNA Ebene.....</b>	<b>31</b>
2.5.1 Isolierung zytoplasmatischer RNA.....	31
2.5.2 cDNA-Synthese mit Random primer.....	32
2.5.3 qRT-PCR.....	32
2.5.4 Primer.....	32
<b>2.6 Analyse der Genexpression auf Proteinebene.....</b>	<b>33</b>
2.6.1 Puffer zur Herstellung von Zelllysaten.....	33
2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.6.3 Western-Blotting.....	34
<b>2.7 Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting).....</b>	<b>36</b>

---

<b>2.8 Materialien zur Klonierung von Plasmiden.....</b>	<b>36</b>
2.8.1 Vektor.....	36
2.8.2 Primer für die Amplifikation genomischer DNA.....	36
2.8.3 Genomische DNA aus Neuroblastomzelllinien.....	36
2.8.4 PCR zur Amplifikation von genomischer DNA.....	36
2.8.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	37
2.8.6 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten.....	37
2.8.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	38
2.8.8 Ligation.....	38
2.8.9 Nährmedien zur Bakterienkultur.....	38
2.8.10 Materialien zur Bakterienkultur.....	39
2.8.11 Selektionsantibiotika.....	39
2.8.12 Bakterienstamm zur Transformation.....	39
2.8.13 Plasmid-Aufreinigung.....	39
2.8.14 Mini-Prep (Boiling Method).....	39
<b>2.9 Mutagenese.....</b>	<b>40</b>
<b>2.10 Material für tierexperimentelle Arbeiten.....</b>	<b>41</b>
2.10.1 Mausstämme.....	41
2.10.2 Injektion.....	41
2.10.3 Organentnahme.....	41
2.10.4 Homogenisierung von Gewebe.....	41
2.10.5 RNA-Isolierung mit TRIzol®.....	42
2.10.6 qRT-PCR.....	42
<b>3 Methoden.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Zellkultur.....</b>	<b>43</b>
3.1.1 Zellkulturbedingungen.....	43
3.1.2 Passagieren von Zellen.....	43
3.1.3 Aktivierung des E2F-1-ER Fusionsproteins in 1A3-Zellen.....	43
3.1.4 Auftauen von Zellen.....	44
3.1.5 Einfrieren von Zellen.....	44
3.1.6 Bestimmung der Zellzahl.....	44

---

<b>3.2 Transfektionen und Luciferase-Reporter-Gen-Assays.....</b>	<b>45</b>
3.2.1 Transiente Transfektionen mit Lipofectin Reagent (Invitrogen).....	45
3.2.2 Herstellung von Zelllysaten.....	48
3.2.3 Messung der Luciferase-Aktivität.....	48
3.2.4 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität.....	49
3.2.5 Proteinbestimmung nach Bradford.....	49
<b>3.3 Transfektion von GFP-Fusionsproteinen.....</b>	<b>50</b>
3.3.1 Transfektion von GFP-Fusionsproteinen mit Lipofectin Reagent.....	50
3.3.2 Fixierung und Herstellung von Präparaten zur Mikroskopie.....	50
<b>3.4. Analyse der Genexpression auf RNA- Ebene.....</b>	<b>51</b>
3.4.1. RNA-Isolierung.....	51
3.4.2 cDNA-Synthese mit Random primer.....	52
3.4.3 Quantitative RT- PCR.....	52
<b>3.5 Analyse der Genexpression auf Proteinebene.....</b>	<b>54</b>
3.5.1 Lysatpräparation für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	54
3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	54
3.5.3 Western-Blotting.....	55
3.5.4 Detektion der aufgetrennten Proteine.....	56
<b>3.6 Quantitative PCR zur Quantifizierung von Chromatin- Immunopräzipitationen.....</b>	<b>57</b>
<b>3.7 FACS Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting).....</b>	<b>57</b>
3.7.1 Prinzip der FACS-Analyse.....	57
3.7.2 Färbung der Zellen mit Propidiumjodid.....	58
<b>3.8 Klonierung von Plasmiden, Restriktionsverdau und Ligation von DNA-Fragmenten.....</b>	<b>59</b>
3.8.1 Klonierung eines <i>FOXO1</i> -Promotor-abhängigem Reporter-Genkonstruktes.....	59
3.8.2 PCR zur Amplifikation des Inserts mit genomischer DNA.....	60

---

3.8.3 Gelelektrophorese von PCR-Produkten und Vektoren.....	61
3.8.4 Gelextraktion und Aufreinigung.....	61
3.8.5 Verdau mit Restriktionsenzymen.....	61
3.8.6 Ligation.....	62
3.8.7 Transformation in Bakterien.....	62
3.8.8 Mini-Prep (Boiling Method).....	63
3.8.9 Restriktionsverdau zur Identifizierung der Plasmide.....	63
3.8.10 Maxi-Prep.....	64
<b>3.9 Mutagenese.....</b>	<b>64</b>
<b>3.10 Tierexperimentelle Methoden.....</b>	<b>65</b>
3.10.1 Tierhaltung.....	65
3.10.2 Induktion der Cre-Aktivität durch Tamoxifen.....	66
3.10.3 Tötung von Versuchstieren, Organentnahme und Gewebeasservation.....	66
3.10.4 RNA-Isolierung aus Gewebe mit TRIzol <sup>®</sup> und cDNA-Synthese .....	67
3.10.5 Allel-spezifische qRT-PCR und die relative Quantifizierung nach der komparativen Ct-Methode.....	68
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>69</b>
<b>4.1 E2F-1 induziert die Genexpression von FOXO1 und FOXO3A.....</b>	<b>69</b>
<b>4.2 FOXO1 und FOXO3A sind direkte Zielgene von E2F-1.....</b>	<b>70</b>
<b>4.3 Aktivierung des FOXO1 Promotors durch E2F.....</b>	<b>72</b>
4.3.1 Der humane FOXO1 Promotor enthält potentielle Bindungsstellen für E2F.....	72
4.3.2 E2F aktiviert den humanen FOXO1 Promotor im transienten Assay.....	73
4.3.3 Mutagenese einer E2F-Bindungsstelle im FOXO1 Promotor.....	74
4.3.4 E2F aktiviert mutierten FOXO1 Promotor im transienten Assay.....	75

---

<b>4.4 E2F bindet den <i>FOXO1</i> Promotor <i>in vivo</i>.....</b>	<b>77</b>
4.4.1 E2F-1-ER bindet den <i>FOXO1</i> Promotor <i>in vivo</i> .....	77
4.4.2 Endogenes E2F bindet den <i>FOXO1</i> Promotor <i>in vivo</i> .....	78
4.4.3 E2F-1 abhängige Acetylierung der Histone H3 und H4 am <i>FOXO1</i> Promotor.....	79
<b>4.5 <i>FOXO1</i> wird unabhängig vom Zellzyklus reguliert.....</b>	<b>82</b>
<b>4.6 E2F-1 beeinflusst nicht die Aktivierung von Genen durch FoxO.....</b>	<b>84</b>
<b>4.7 In der Neuroblastomzelllinie 1A3 sind GFP-FoxO Fusions- proteine im Zellkern lokalisiert.....</b>	<b>89</b>
<b>4.8 Konditionelle systemische Rekombination eines geflochten Allels in der Maus.....</b>	<b>90</b>
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>96</b>
5.1.1 <i>FOXO1</i> ist ein direktes Zielgen von E2F-1.....	96
5.1.2 <i>FOXO1</i> ist Zielgen von E2F-1, welches unabhängig vom Zellzyklus reguliert wird.....	97
5.1.3 E2F-1 beeinflusst nicht die Aktivierung von FoxO1 Zielgenen im transienten Assay.....	98
5.1.4 Bedeutung der Ergebnisse und Perspektiven für den Transkriptionsfaktor FoxO1 im Neuroblastom.....	99
5.2.1 Induzierbare systemische Rekombination eines geflochten Allels in der Maus.....	101
5.2.2 Faktoren, die die Effizienz der Tamoxifen induzierbaren Cre-Rekombinase beeinflussen.....	102
5.2.3 Geno- und zytotoxische Effekte von Cre-Rekombinasen.....	104
5.2.4 Bedeutung der Ergebnisse für den zukünftigen Einsatz Fonds des konditionellen Mausmodells.....	105
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>106</b>
6.1.1 Zusammenfassung: <i>FOXO1</i> ist ein Zielgen von E2F-1.....	106

---

6.1.2 Zusammenfassung: Die induzierbare systemische Rekombination eines konditionellen Allels in der Maus.....	107
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>108</b>
<b>8 Anhang.....</b>	<b>145</b>
8.1 Abkürzungen.....	145
8.2 Akademische Lehrer.....	151
8.3 Danksagung.....	152
8.4 Ehrenwörtliche Erklärung.....	153

## 1 Einleitung

### 1.1 Krebs – eine Krankheit des Genoms

Der Begriff Krebs wurde vermutlich von Hippokrates (ca. 460-370 v. Chr.) als erstes eingeführt. Hippokrates beschrieb in seinem Werk ein Brustgeschwür, das Ähnlichkeit mit den Beinen eines Krustentieres aufwies (Corpus Hippokratikum). Der von griechischen Heilkundlern um 300 v. Chr. geprägte Begriff für äußerlich sichtbares Zellwachstum ist bis ins 21. Jahrhundert erhalten geblieben und steht weiterhin für Erkrankungen, die mit einer übermäßigen Vermehrung von Zellen einhergehen. Nach dem heutigen Verständnis hat Krebs seinen Ursprung in einer einzigen Zelle, die die Fähigkeit zur unbegrenzten, unkontrollierten und autonomen Vermehrung erlangt hat (Hanahan und Weinberg, 2000; Campisi, J., 2003). Zudem sind diese Zellen in der Lage, invasiv ins Gewebe einzudringen und reagieren auf äußere wachstumshemmende Signale nicht mehr (Campisi, J., 2003). Ursache für dieses Wachstumsverhalten von Zellen sind Veränderungen der DNA. Sie können endogen z.B. durch zufällige Replikationsfehler während der DNA-Synthese innerhalb des Zellzyklus entstehen. Die spontane Mutationsrate im Menschen beträgt durchschnittlich  $5 \times 10^{-11}$  Mutationen pro Zellteilung (Drake, J.W., 1998). Aber auch bei dem normalen Metabolismus in der Zelle zur Energiebereitstellung fallen Sauerstoffradikale an, die zur DNA-Schädigung führen (Burcham, P.C. 1999; Marnett und Plastaras, 2001). Exogene Noxen (z.B. radioaktive Strahlung, UV-Strahlung, virale Infektionen) führen ebenfalls zu Mutationen in Keimzellen und somatischen Zellen (Kazakov et al., 1992; Sarasin, A., 1999; zur Hausen, H. 1999). Ebenso können Mutationen der DNA bereits in der Keimbahn angelegt worden sein. Es existieren ca. 100 familiäre Krebs-Syndrome, bei denen Mutationen in der Keimbahn nachgewiesen wurden. (z.B. Familiäre adenomatöse Polyposis, Li-Fraumeni-Syndrom, Neurofibromatose) (Harrisons, Innere Medizin, 2002). Der Zusammenhang zwischen Veränderungen im Genom und der Kanzerogenese wurde erstmals von Boveri 1914 postuliert (Boveri, 1914). Auf der Grundlage von Boveris Theorie konnten drei Klassen von Genen charakterisiert werden, die bei der Krebsentstehung involviert sind (Vogelstein, B. et al., 2000; Sherr, C.J., 2004). Dazu gehört die Gruppe der Onkogene. Als Protoonkogene fördern sie normales Zellwachstum. Wird diese Gruppe von

Genen durch Punktmutationen, Amplifikation oder Dysregulation aktiviert, konvertiert sie zum Onkogen und führt zum unkontrollierten Zellwachstum (Weinberg, R.A., 1989). Das GTP bindende Ras ist ein Beispiel für ein Onkogen, welches in vielen humanen Tumoren z.B. Pankreas-Ca, Mamma-Ca, Kolon-Ca und Lungenkrebs aktiviert ist (Anderson et al., 1992). Eine andere Gruppe von Genen, die zur Malignomentstehung beitragen, sind DNA-Reparaturgene. Sie schützen das Genom vor Mutationen (Lindahl und Wood, 1999; Campisi, J., 2003). Tumorsuppressorgene sind als dritte Gruppe von Genen bei der Krebsentstehung involviert. Tumorsuppressorproteine können unter anderen als Wachstumsbremse für die Zelle agieren, indem sie den Zellzyklus Arrest initiieren, den Programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen oder die Teilung der Zelle verhindern (Vogelstein et al., 2000). Das Retinoblastom Protein wurde als erstes Tumorsuppressorprotein in Retinoblastomen identifiziert und ist bei der Regulation des Zellzyklus beteiligt (Friend et al., 1986; Lee et al, 1987; Fung et al., 1987; Weinberg, R.A., 1995). Knudson hat 1971 für das Retinoblastom als Tumorsuppressorgen die „*two hit hypothesis*“ eingeführt, die davon ausgeht, dass ein mutiertes Allel eines Tumorsuppressorgenes nicht ausreicht für das maligne Wachstum von Zellen. Erst der Verlust der Heterozygotie für das Tumorsuppressorgen (LOH) induziert malignes Wachstum (Knudson, 1971). Allerdings lässt sich Knudsons „*two hit hypothesis*“ nicht auf alle Tumorsuppressorgene anwenden. Es gibt Tumorsuppressorgene bei denen eine Haploinsuffizienz (z.B. APC, p27<sup>Kip1</sup>) bereits zu Tumorwachstum führt (Paige, 2003).

Die Transformation somatischer Zellen in Tumorzellen wurde von Peter Nowell als mehrschrittigen Prozess beschrieben (Nowell, P., 1976). 5 bis 10 Mutationen müssen im Genom akkumulieren, um malignes Wachstum von somatischen Zellen induzieren zu können (Hanahan und Weinberg, 2000).

Die Zelle verfügt grundsätzlich über zwei Prinzipien der Tumorsuppression (Campisi, J., 2003). Ein Mechanismus verläuft über „caretaker Proteine“, die die Integrität des Genoms schützen (z.B. RECQ-like Helicase) (Karow et al., 2000). Der andere Mechanismus benutzt sog. „gatekeeper Proteine“, die die Zellproliferation beeinflussen, potentielle Krebszellen eliminieren oder eine weitere Teilung dieser Zellen unterbinden (Kinzler und Vogelstein, 1997). p53 und Rb sind wichtige Tumorsuppressorproteine, die als „gatekeeper“, über die

weitere Existenz der Zelle entscheiden (Campisi, J., 2003). Zellen können durch Apoptose aus dem Gewebe eliminiert werden oder sie nehmen einen Ruhe - zustand an (Seneszenz), der sie zu einer weiteren Zellteilung nicht mehr befähigt (Reed, J.C., 1999; Campisi, J., 2001). Die Seneszenz wurde erstmals 1961 von Hayflick und Moorhead beobachtet, die mit diesem Begriff der „Zellalterung“ den terminalen Teilungsstopp bei kultivierten Fibroblasten nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen charakterisierten (Hayflick und Moorhead, 1961). Der zugrunde liegende Mechanismus für diese Form der Seneszenz ist die Verkürzung der Telomeren mit jeder Zellteilung (Harley et al., 1990).

Zellulärer Stress, aktivierte Onkogene und reaktive Sauerstoffspezies induzieren eine telomer-unabhängige Form der Seneszenz als Tumorsuppressor-Mechanismus bei dem die Zelle weiter lebt, aber sich nicht mehr teilen kann (Serrano et al., 1997; Wright und Shay, 2001; Campisi, J., 2001). Die onkogen-induzierte Seneszenz ist ein wichtiger Mechanismus der das Wachstum von prämaligen Zellen verhindert (Michaloglou et al., 2005; Braig et al., 2005; Collado et al., 2005). Des weiteren werden senescente, überalterte Erythrocyten von Makrophagen erkannt und elimiert (Ensinck et al., 2006). Hier hat die Seneszenz eine physiologische Funktion in der Erythrozytenphagozytose.

## 1.2 Der Zellzyklus und die Rb/E2F Interaktion

Die Entstehung von Krebs beginnt mit der Dysregulation des Zellzyklus, was zu einer ungehemmten Zellvermehrung führt (Vogelstein et al., 2000). Deshalb unterliegt die Zellteilung strengen Kontrollmechanismen, um unerwünschtes unkontrolliertes Zellwachstum, zu unterbinden. Zudem muss die Zelle in der Lage sein, akut auf schädigende äußere Einflüsse, die während des Zellzyklus auftreten können, zu reagieren. Irreversible DNA-Schäden können dazu führen, dass die Zellen an spezifischen Kontrollpunkten innerhalb des Zellzyklus „stecken bleiben“ oder die Zelle den programmierten Zelltod (Apoptose) auslöst (Kaina, B., 2003). Der Zellzyklus ist in seinem Ablauf genau festgelegt. Der Eintritt der Zelle in die einzelnen Phasen des Zellzyklus wird durch Übergangs- und Kontrollpunkte initiiert (Lundberg und Weinberg, 1999; Wassmann und Benezra, 2001).

Der Zellzyklus besteht aus vier Phasen (Pines, 1993). Nach Beendigung der Mitose tritt die proliferierende Zelle in die G<sub>1</sub>-Phase ein (G= gap, eng. Lücke). In dieser Phase findet Zellwachstum statt, und die Zelle synthetisiert Proteine und Bausteine als Vorbereitung auf die DNA-Replikation. Unter bestimmten Bedingungen, z.B. Substratmangel, können die Zellen von der G<sub>1</sub>-Phase in die G<sub>0</sub>-Phase eintreten und einige Zelltypen verharren in dieser Phase lebenslänglich. Nach der G<sub>1</sub>-Phase folgt die S-Phase, in der die Synthese der DNA stattfindet. Nach der S-Phase ist der Chromosomensatz der Zelle tetraploid. Es folgt der Übergang in die G<sub>2</sub>-Phase. Der G<sub>2</sub>-Phase schließt sich die M-Phase als eigentliche Zellteilung an. Hierbei wird der tetraploide Chromosomensatz auf zwei Zellen verteilt (Norbury und Nurse, 1992; Löffler, Petrides, 1998).

Entscheidende Kontrollpunkte innerhalb des Zellzyklus sind beim Eintritt von Zellen aus der G<sub>0</sub> in die G<sub>1</sub>-Phase, bei dem G<sub>1</sub>/S Übergang, bei dem G<sub>2</sub>/M Übergang und unmittelbar vor und nach der Mitose (Kastan und Bartek, 2004; Shimada und Nakanishi, 2006). Eine Schlüsselkomponente in der Kontrolle des Zellzyklus ist das Retinoblastom Protein (pRb). Es gehört mit p107 und p130 zur Familie der Pocketproteine. Die Bezeichnung „Pocketproteine“ für pRb, p107 und p130 leitet sich von einer konservierten DNA Bindungsdomäne dieser Proteine ab, an die z.B. Transkriptionsfaktoren (E2F) und virale Onkoproteine binden können (Whyte, P. et al., 1988; Dyson, N. et al., 1989). pRb wird innerhalb des Zellzyklus durch Cdk/Cyclin Komplexe phosphoryliert und kann als hyperphosphoryliertes Protein nicht mehr mit seinen Interaktionspartnern wie z.B. E2F Komplexe bilden (Weinberg, 1995; Sanchez und Dynlacht, 1996). Wichtige biologische Funktionen von pRb sind die Tumorsuppression und die Regulation des Zellzyklus. Über 100 Proteine interagieren mit dem pRb (Morris und Dyson, 2001). Die am häufigsten untersuchten Bindungspartner von Rb sind die E2F Transkriptionsfaktoren. pRb und der Transkriptionsfaktor E2F sind die Schlüsselregulatoren bei dem G<sub>1</sub>/S-Übergang im Zellzyklus (Goodrich et al., 1991). Über den Rb/E2F- Signalweg wird die Transkription von E2F abhängigen Genen kontrolliert. Solange E2F an pRb gebunden ist, wird die Transkription der E2F-abhängigen Gene unterbunden. Diese Bindung ist abhängig vom Phosphorylierungsstatus des pRb (Chellappan et al., 1991). Während der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus ist das pRb gering phosphoryliert und liegt im Komplex mit E2F vor. In diesem

Zustand wirkt E2F als Repressor der Transkription seiner Zielgene. In der Gegenwart von Wachstumsfaktoren treten die Zellen zur Vorbereitung auf die Zellteilung in den Zellzyklus ein. Gegen Ende der G<sub>1</sub>-Phase wird das pRb hyperphosphoryliert und komplexiert nicht mehr E2F. Das „freie“ E2F ist dann ein Transaktivator für seine Zielgene (Rowland und Bernhards, 2006). Mitogene Wachstumsfaktoren führen zu einem Komplex aus Cyclin D mit Cdk4/6. Dieser Cyclin D/Cdk4/6 aktivierte Komplex entsteht während der frühen G<sub>1</sub>-Phase und phosphoryliert pRb (Lundberg und Weinberg, 1999). Das phosphorylierte pRb dissoziiert von E2F. Das freie E2F kann nun transkriptionell aktiv werden und die Synthese von Zellzyklusregulatoren (z.B. Cyclin E, Cyclin A) oder Enzyme für die DNA-Replikation (Dihydrofolatreduktase, Thymidinkinase) freigegeben (Trimarchi und Lees, 2001). Die Cdk's sind nur aktiv als Holoenzym in Komplexen mit den Cyclinen. Die Aktivität der Cyclin- und Cyclin E abhängigen Kinasen wird durch die „Cip/Kip“ Familie der Cdk-Inhibitoren (CKI) reguliert (Sherr und McCormick, 2002). Zu dieser Familie der Cdk-Inhibitoren gehören p27<sup>Kip1</sup>, p21<sup>Cip1</sup> und p57<sup>Kip2</sup> (Sherr und Roberts, 1999). Proteine der INK4-Familie (p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> und p19<sup>INK4d</sup>) sind ebenfalls in der Lage die Aktivität der Cyclin D abhängigen Kinase zu inhibieren, und damit die Phosphorylierung der Proteine der Rb-Familie zu unterbinden (Ruas und Peters, 1998; Roussel, 1999; Ortega et al., 2002). In Abb. 1 wird die Rb/E2F Interaktion in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen schematisch dargestellt.

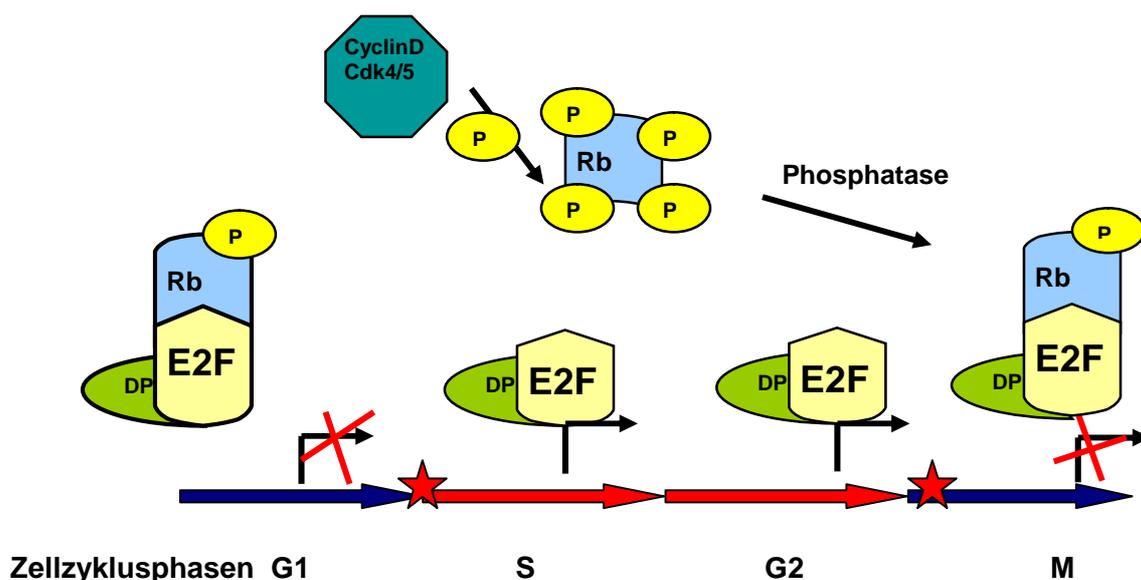


Abb. 1: Regulation der E2F-Aktivität durch die Phosphorylierung von pRb innerhalb des

**Zellzyklus.** Der G<sub>1</sub>/S und der G<sub>2</sub>/M Kontrollpunkt sind mit einem roten Stern markiert.

### 1.2.1 Die E2F-Familie

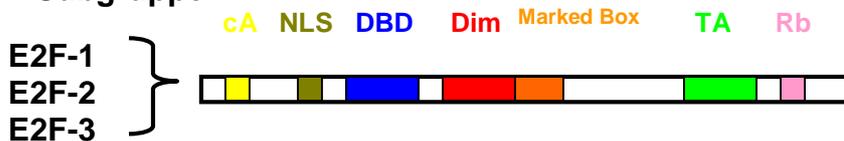
E2F ist ein Schlüsselregulator in der Progression des Zellzyklus, kann aber auch durch Aktivierung seiner Zielgene unter bestimmten Bedingungen Apoptose auslösen. Somit verfügt E2F über „duale Funktionen“ (Adams und Kaelin, 1996). Die apoptotische Wirkung von E2F neben der Zellzyklus-Progression kann als Schutzsignal bei dem Vorhandensein von abnormen Wachstumsstimuli verstanden werden.

E2F wurde als ein humanes DNA-Bindungsprotein, welches für die E1A - abhängige Aktivierung des E2 Promotors von Adenoviren verantwortlich ist, entdeckt (Kovesdi I et al., 1986, Nevins, 1992). Der Name E2F steht deshalb für E2-Promotor Binding Factor. Mittlerweile sind acht Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie identifiziert worden: E2F-1 bis E2F-8. Für die transkriptionelle Aktivität von E2F 1-5 ist die Heterodimerisierung mit einem weiteren Protein notwendig. Der Dimerisierungspartner von E2F ist das DP-Protein (Girling et al., 1993a, 1993b; Wu et al., 1995; Dyson, N. 1998). DP steht für DNA-binding-Protein. In Säugetieren wurden zumindest zwei Mitglieder der DP-Familie: DP-1 und DP-2, identifiziert, die Dimerisierungspartner von E2F sind. (Bandara et al., 1994; Ormondroyd et al., 1995; Milton et al., 2006). Alle E2F und DP Proteine, auch E2F-7 und E2F-8, verfügen über eine konservierte DNA-Bindungs-Domäne (DBD) und eine Dimerisierungsdomäne (Dim). Die Dimerisierungsdomäne umfasst den Leucin-Zipper und eine Transaktivierungsdomäne, die als Marked Box bezeichnet wird (Lees et al., 1993).

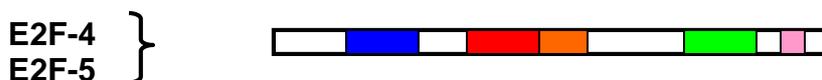
Die E2F Transkriptionsfaktoren lassen sich entsprechend ihrer funktionellen und strukturellen Ähnlichkeiten in Subgruppen einteilen. Der schematische Aufbau der E2F Transkriptionsfaktoren ist in Abb. 2 dargestellt. Zu der ersten Subgruppe gehören: E2F-1, E2F-2 und E2F-3. Sie werden als „aktivierende E2F´s“ bezeichnet. Die „aktivierenden E2F´s“ spielen eine Rolle in der Aktivierung ihrer Zielgene beim Übergang der G<sub>1</sub> in die S-Phase des Zellzyklus und in der Progression des Zellzyklus. Außer der DBD und der Dim mit Marked Box besitzen diese E2F Proteine eine Cyclin A-Bindungs-Domäne (cA), eine transkriptionelle Aktivierungsdomäne, eine Rb-Bindungsstelle am C-Terminus

und ein NLS (nuclear localization signal) (Bracken et al., 2004; Du und Pogriler, 2006). Als zweite Subgruppe werden E2F-4 und E2F-5 als repressive E2F's eingestuft, da sie Repressoren für ihre E2F Zielgene sind (Attwooll C. et al., 2004; Du und Progriler 2006). Die repressiven „E2F's“ haben die gleichen Bindungsdomänen wie die erste Subgruppe außer der cA-Bindungsstelle und dem NLS. Stattdessen sind die Transkriptionsfaktoren E2F-4 und E2F-5 mit einem NES (nuclear export signal) ausgestattet. Die letzte Subgruppe repräsentiert die Transkriptionsfaktoren E2F-6 bis E2F-8. Im Gegensatz zu den beiden anderen Subgruppen haben E2F-6 bis E2F-8 keine Rb-Bindungs-Sequenz am C-Terminus. Somit erfolgt ihre Regulation unabhängig von der Rb Familie. E2F-1, E2F-2 und E2F-3 binden an pRb mit hoher Affinität. Die Transkriptionsfaktoren E2F-4 und E2F-5 interagieren abhängig von der Zellzyklusphase vorwiegend mit p107 und p130 (Moberg et al., 1996; Ikeda et al., 1996; Cress et al., 1993). E2F-4 kann zusätzlich an das pRb binden. Die biologischen Funktionen der E2F Transkriptionsfaktoren, ihre Interaktion mit den entsprechenden Pocketproteinen und der Zeitpunkt ihrer Expression innerhalb des Zellzyklus werden in Tab.1 zusammengefasst.

### 1.Subgruppe



### 2.Subgruppe



### 3.Subgruppe

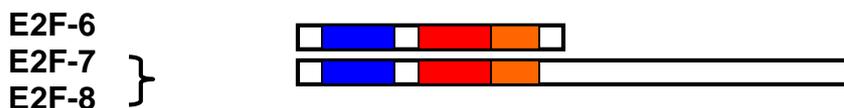


Abb. 2 Schematischer Aufbau der humanen E2F Transkriptionsfaktoren

Protein	Zeitpunkt der Expression	Interaktion mit Pocketprotein	Phase im Zellzyklus im Komplex mit Pocketprotein	NLS	CyclinA/ cdk2-Bindung
<b>Aktivierende E2F's: Proliferation, Apoptose</b>					
E2F- 1	G <sub>1</sub> /S-Phase	pRb	G <sub>0</sub> , S, G <sub>1</sub>	+	+
E2F- 2	G <sub>1</sub> /S-Phase	pRb	G <sub>0</sub> , S, G <sub>1</sub>	+	+
E2F- 3	G <sub>1</sub> /S-Phase	pRb	G <sub>0</sub> , S, G <sub>1</sub>	+	+
<b>Repressive E2F's: Differenzierung</b>					
E2F- 4	konstitutiv	pRb, p107,p130	G <sub>0</sub> ,S		
E2F- 5	konstitutiv	p107, p130	G <sub>0</sub> ,S	-	-

**E2F- 6: Entwicklung, Differenzierung**

**E2F- 6** konstitutiv ----- + -

**E2F-7** konstitutiv ----- - +  
**E2F-8**

**Tab.1: Schema der E2F Subgruppen mit ihren biologischen Funktionen und spezifischen Bindungspartnern**

### 1.2.2 E2F-1 induzierte Apoptose

E2F-1 kann sowohl die Proliferation beeinflussen, als auch Apoptose induzieren (Adams und Kaelin, 1996; Bell und Ryan; 2004). In experimentellen Systemen wurde beobachtet, dass E2F-2 und E2F-3 als aktivierende Transkriptionsfaktoren ebenfalls in der Lage waren Apoptose aus zu lösen (Vigo et al, 1999; Bell et al., 2006). Die proapoptotische Aktivität der aktivierenden E2F Transkriptionsfaktoren kann die Antwort auf onkogenen Stress sein, um prä-maligne Zellen zu vernichten und somit ein Tumorwachstum zu verhindern. Die Apoptoseinduktion durch E2F-1 konnte durch eine E2F-1 Überexpression *in vitro* (Wu und Levine, 1994; Kowalik et al.,1998) und *in vivo* (Holmberg et al., 1995; Pierce et al., 1998) beobachtet werden.

E2F-1 kann als Onkogen und zugleich als Tumorsuppressor angesehen werden. Die onkogenen Eigenschaften von E2F-1 resultieren aus der Regulation von Genen, die im Zellwachstum involviert sind (DeGregori et al., 1995; Sherr, C.J. 1996). Die tumorsuppressive Funktion von E2F-1 konnte in *E2F-1<sup>-/-</sup>* Mäusen gezeigt werden. Diese haben eine höhere Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli und haben eine höhere Inzidenz für die

Entwicklung von Tumoren (Yamasaki et al., 1996). Allerdings sind die tumorsuppressiven bzw. die onkogenen Eigenschaften der aktivierenden E2F Transkriptionsfaktoren immer abhängig von den gewählten Versuchsbedingungen (Pierce et al., 1999). So können in einem transgenen Maus-Modell in Abhängigkeit von den gewählten Versuchsbedingungen onkogene oder tumorsuppressive Funktionen von E2F Transkriptionsfaktoren beobachtet werden (Johnson und DeGregori, 2006).

In Zellen, die kein funktionelles p53 exprimieren, führte eine E2F-1 Überexpression zu einer erhöhten Zytotoxizität unter ionisierender Strahlung (Pruschy et al., 1999; Meng et al., 1999). Eine Zunahme der Expression von E2F-1 konnte als direkte Antwort der Zelle auf genotoxischen Stress, z.B. bei der Exposition mit DNA-schädigenden Agenzien, beobachtet werden (Blattner et al., 1999). Damit nimmt der Transkriptionsfaktor E2F-1 eine Funktion als Schutzschalter ein, um bei einem Ausfall von Tumorsuppressorgenen oder in Gegenwart von zellschädigenden Noxen eine Proliferation und malignes Wachstum von Zellen zu unterbinden.

In vielen Tumoren des Menschen (SCLC, Ovarialkarzinom, Nierenzell-Karzinom, Blasen-Karzinom, Sarkome, Retinoblastome) ist der Tumorsuppressor Rb inaktiv (Horowitz et al., 1990; Ishikawa et al., 1991; Gouyer, et al., 1998). Die Rb Inaktivität führt zur Dysregulation der E2F-1-Aktivität, da Rb die Aktivität von E2F kontrolliert. (Johnson und DeGregori, 2006). Genetische Alterationen in *E2F* Genen wurden in verschiedenen Tumoren (Blasen-Ca, Prostata-Ca, Retinoblastom) identifiziert (Feber et al., 2004; Orlic et al., 2006; Olsson et al., 2007). In Kolon- und Blasentumoren, die einen aggressiven Krankheitsverlauf zeigten, wurde eine reduzierte E2F1 Expression festgestellt (Zacharatos et al., 2004).

Der E2F-1 vermittelte Zelltod kann über die Aktivierung von proapoptotischen Zielgenen erfolgen (Ginsberg, D. 2002; Hershko und Ginsberg, 2003). E2F-1 kann direkt an den Promotor von Genen der proapoptotischen BH3-only Proteinfamilie binden und deren Genexpression induzieren. Zu dieser Gruppe gehören PUMA, Noxa, Bim und Hrk/DP5. Die verstärkte E2F-1 Expression mündet in die Akkumulation der Caspase-2, Caspase-3, Caspase-7, Caspase-8 und Caspase-9 durch direkte transkriptionelle Mechanismen (Nahle et al., 2002). E2F-1 kann aber auch über p53 abhängige Signale die Kaskade der Caspasen aktivieren (Wu und Levine, 1994). Das Wissen über die duale Rolle

von E2F-1, als Initiator der Zellzyklus-Progression und der Apoptose, könnte zur Entwicklung von molekularen Therapeutika beitragen. In klinischen Studien werden bereits anti-apoptotische E2F-1 regulierte Zielgene der Bcl-2 Familie als Angriffspunkt in der Tumorthherapie eingesetzt. Zum Beispiel werden Bcl-2 Antisense Oligonukleotide in einer Phase II Studie bei Patienten mit multiplen Myelom angewendet (Bradros et al, 2005). Die Inhibition des anti-apoptotischen Bcl-2 führt zur Aktivierung der mitochondrial gesteuerten Apoptose und kann eine Therapieoption für Tumoren sein, die auf keine Chemotherapie ansprechen. Ebenso wäre bei neurodegenerativen Erkrankungen, die zum Verlust von Zellen führen, eine Inhibierung von proapoptotischen E2F Zielstrukturen denkbar, um Apoptose von Neuronen zu verhindern. Auch auf diesem Gebiet wird an einer *in vivo* Gentherapie gearbeitet (Mochizuki et al., 2002). Die Therapie muss allerdings so konstruiert werden, dass selektiv krankes Gewebe erfasst wird, während gesundes Gewebe von der Therapie nicht beeinflusst wird.

### 1.3 Die FoxO Transkriptionsfaktoren als Ziel von E2F-1

#### 1.3.1 Die FoxO Familie der Forkhead Transkriptionsfaktoren

Die FoxO Transkriptionsfaktoren gehören zur Familie der „Forkhead Proteine“. 1989 wurde das erste Mitglied der FoxO Transkriptionsfaktoren in der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* identifiziert (Weigel et al., 1989). Die FoxO Transkriptionsfaktoren zeichnen sich durch eine charakteristische DNA-Bindungsdomäne aus, die als „Forkhead box“ bezeichnet wird (Weigel und Jackle, 1990; Kaestner et al., 2000). Diese 100 Aminosäuren lange, monomerische DNA-Bindungsdomäne besteht aus 3  $\alpha$ -Helices mit zwei charakteristischen „loops“ (eng. Schleife) zur Bindung an die DNA. Daher leitet sich die Bezeichnung „winged helix factors“ für die Forkhead Transkriptionsfaktoren ab (Kaestner et al., 2000). Vertreter der Forkhead Familie existieren in allen eukaryontischen Zellen. Beim Menschen sind bis jetzt 39 Mitglieder der Forkhead Transkriptionsfaktoren identifiziert worden, die in 19 Subgruppen von A bis S eingeteilt werden. Der Name FoxO setzt sich aus der **F**orkhead **box** und der Subgruppe **O** zusammen. Zu den humanen FoxO Transkriptionsfaktoren der Subgruppe O gehören: FoxO1 (FKHR), FoxO3

(FKHRL1) und FoxO4 (AFX) und FoxO6. Die humanen FoxO Transkriptionsfaktoren wurden erstmals in chromosomalen Translokationen menschlicher Tumoren identifiziert (Galili et al., 1993, Davis et al., 1994, Parry et al., 1994, Borkhardt et al., 1997, Hillion et al., 1997). Aufgrund der Tatsache, dass die FoxO Familie an chromosomalen Translokationen in Tumoren beteiligt ist, scheint sie auch bei der Entstehung von malignen Tumoren mitzuwirken. Die FoxO Transkriptionsfaktoren sind involviert bei den Kontrollpunkten innerhalb des Zellzyklus, bei DNA-Reparaturmechanismen, bei Schutz vor oxidativem Stress und die FoxO Transkriptionsfaktoren initiieren Apoptose über die transkriptionelle Aktivierung proapoptotischer Zielgene.

Gerade Systeme der Zellzykluskontrolle, DNA-Reparaturmechanismen und die Reaktion auf oxidativen Stress werden bei der Krebserkrankung bis hin zur Funktionsunfähigkeit dysreguliert, was zu unkontrolliertem Zellwachstum und Akkumulierung von DNA Schäden führt. Eine Dysregulation der FoxO Transkriptionsfaktoren konnte in einigen Tumorarten wie z.B. bei Brustkrebs, Prostatakrebs, CML, Rhabdomyosarkomen und Leukämien nachgewiesen werden (Arden, K.C., 2006).

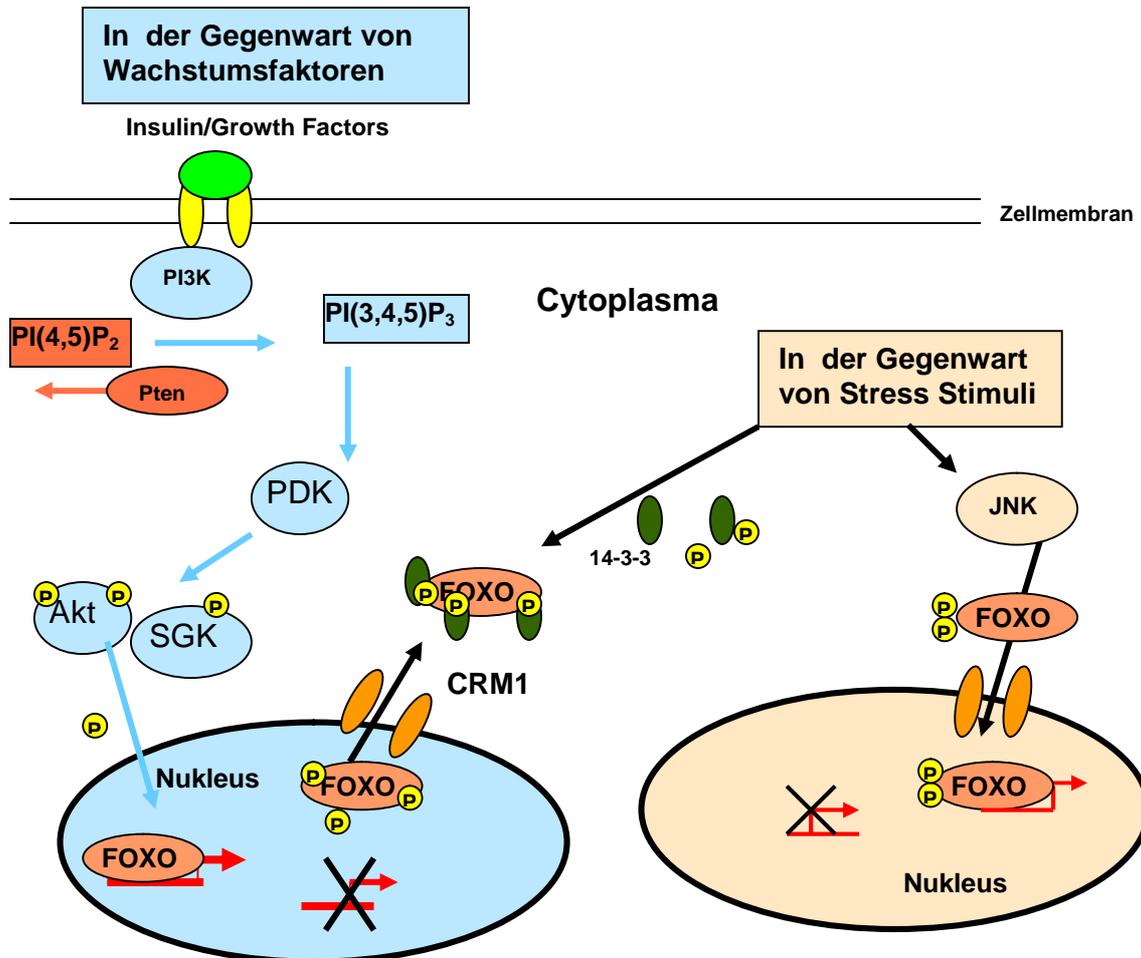
Die FoxO Transkriptionsfaktoren erfüllen, wie E2F, viele Funktionen eines Tumorsuppressors und bieten somit einen Angriffspunkt für die Tumorentstehung. FoxO1 defiziente Mäuse zeigten eine abnormale Angiogenese in der Embryonalentwicklung, die mit einer Letalität einher geht (Furuyama et al., 2004; Hosaka et al., 2004). Um die Rolle von FoxO in der Tumorentwicklung zu untersuchen, wurde von DePinho ein konditionelles Mausmodell entwickelt, mit dem bei adulten Mäusen FoxO1, FoxO3 und FoxO4 deletiert werden können (Paik et al., 2007). Bei gleichzeitiger Inaktivierung aller drei *FOXO* Gene konnten Lymphome des Thymus und Hämangiome in bestimmten Organsystemen (Leber) beobachtet werden. Diese Arbeit belegt eindeutig eine Rolle von FoxO in der Tumorsuppression. Allerdings beschränkt sich die Tumorentstehung in den FoxO-defizienten Mäusen auf bestimmte Zelllinien und Organsysteme, während ein Ausfall des Pten/PI3K Signalweges in einem breiten Spektrum von Tumoren vertreten ist (Paik et al., 2007, Arden, 2008).

### 1.3.2 Posttranslationelle Regulation der FoxO-Proteine

Die transkriptionelle Aktivität der FoxO Transkriptionsfaktoren wird unter anderem gesteuert durch ihren Phosphorylierungsstatus. Die Phosphorylierung der FoxO Transkriptionsfaktoren geschieht in Abhängigkeit von extrazellulären Signalen wie Wachstumsfaktoren, Insulin oder intrazellulären Stimuli z.B. oxidativem Stress (Brunet et al., 1999, 2001; Burgering und Medema 2003; van der Heide et al., 2004). Die posttranslationelle Regulation der FoxO-Proteine ist ein Signalweg, der in Würmern, Fliegen und Säugetieren vorhanden ist (Henderson und Johnson, 2001; Lin et al., 2001; Essers et al., 2004).

In der Gegenwart von Wachstumsfaktoren oder Insulin wird FoxO direkt von der Proteinkinase Akt (PKB) phosphoryliert (Kops et al., 1999; Tang et al., 1999; Rena et al., 1999). Akt phosphoryliert drei der vier humanen FoxO Transkriptionsfaktoren (FoxO1, FoxO3 und FoxO4) an einem Threoninrest und zwei Serinresten. Diese regulatorischen Phosphorylierungsstellen bestimmen in Abhängigkeit des Phosphorylierungsstatus die subzelluläre Lokalisation der FoxO Transkriptionsfaktoren (Biggs III et al., 1999; Takaishi et al., 1999). In Anwesenheit von Wachstumsfaktoren oder Insulin werden die FoxO Transkriptionsfaktoren über den PI3K-Akt/SGK Signalweg phosphoryliert, was zum Transport der FoxO Proteine aus dem Zellkern und damit zur Inaktivierung der Proteine führt. Am Export der FoxO Transkriptionsfaktoren aus dem Zellkern sind die Proteine 14-3-3 und CRM1 beteiligt (Brownawell, A.M., 2001; van der Heide, L.P. et al., 2004, Obsil und Obsilova, 2008). In Abwesenheit von Wachstumssignalen befinden sich die FoxO Transkriptionsfaktoren im Zellkern und sind transkriptionell aktiv. Die Aktivität der PI3K wird reguliert durch das Tumorsuppressorprotein Pten. Pten dephosphoryliert PIP2 und PIP3 und führt damit zur Inaktivierung der Signaltransduktion über den Akt-Signalweg. Die SGK (serum and glucocorticoid-induced Kinase) wird ebenfalls durch extrazelluläre Stimuli aktiviert und phosphoryliert die FoxO Transkriptionsfaktoren an den gleichen Phosphorylierungsstellen wie die Akt (Brunet et al., 2001). Weitere Kinasen, die die Aktivität von FoxO über eine Phosphorylierung regulieren können, sind die CK1 (Casein kinase 1) und die DYRK1a Kinase (dual-specificity tyrosine phosphorylated regulated kinase 1a). Die DYRK1a Kinase wurde als Mitglied der MAPK (mitogen-activated protein kinase) Familie identifiziert. *In vitro* führte die Phosphorylierung von FoxO1 an

S<sup>329</sup> durch die DYRK1a Kinase zum Transport von FoxO in den Nukleus (Woods et al., 2001). Oxidativer Stress, Hitze Schock oder UV-Strahlung induzieren die Phosphorylierung der FoxO Transkriptionsfaktoren. JNK, ein weiteres Mitglied der MAPK Familie wird aktiviert unter Stress Stimuli und phosphoryliert FoxO4 an Thr 447 und Thr 451 (Essers, M.A. et al., 2004). Diese Phosphorylierung von FoxO4 durch die JNK resultiert in der Translokation von FoxO4 aus dem Zytoplasma in den Nukleus. Die über JNK regulierte transkriptionelle Aktivität von FoxO4 scheint den lebensverlängernden Effekt der FoxO Transkriptionsfaktoren in Würmern und Fliegen zu begünstigen (Oh et al., 2005; Wang et al., 2003, 2005). Neben der Regulation von FoxO durch Phosphorylierung, was im nukleären-zytoplasmatischen Shuttling von den FoxO Transkriptionsfaktoren resultiert, spielt die Acetylierung und Deacetylierung der FoxO Transkriptionsfaktoren für ihre transkriptionelle Aktivität ebenfalls eine Rolle. SIRT1 gehört zu der Sir2 Familie der NAD<sup>+</sup> abhängigen Deacetylasen. SIRT1 katalysiert als Antwort auf oxidativen Stress die Deacetylierung von FoxO Transkriptionsfaktoren (Calnan und Brunet, 2008). Die SIRT1/FoxO Interaktion beeinflusst wiederum die Expression von Genen, die an DNA-Reparaturmechanismen (*GADD45*), und Zellzyklusarrest (*p27<sup>kip1</sup>*) und bei der Antwort auf oxidativen Stress (*MnSOD*) beteiligt sind (Brunet et al., 2004; Giannakou und Patridge, 2004). Diese SIRT1/FoxO Interaktion führt zur Resistenz gegenüber Stress Stimuli in der Zelle und hat somit einen Einfluss auf die Verlängerung der Lebensspanne. Die posttranslationelle Regulation der FoxO Transkriptionsfaktoren wurde bereits intensiv erforscht. Dagegen ist über die Regulation der Transkription der *FOXO* Gene nichts bekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll deshalb die transkriptionelle Regulation der *FOXO* Gene untersucht werden.



**Abb. 3: Regulation und die subzelluläre Lokalisation von FoxO Transkriptionsfaktoren.**

In Abwesenheit von Wachstumssignalen sind die FoxO Transkriptionsfaktoren im Kern lokalisiert und transkriptionell aktiv. In der Gegenwart von Wachstumssignalen werden die Kinasen aktiviert, die die FoxO Transkriptionsfaktoren phosphorylieren. Phosphoryliertes FoxO bindet an 14-3-3 und verlässt CRM1-vermittelt den Zellkern. Dadurch wird die Transkription FOXO-abhängiger Gene inhibiert. In der Antwort auf Stress phosphoryliert JNK 14-3-3 Proteine, die ihre Bindung zu FoxO verlieren. Ebenso phosphoryliert die JNK FoxO Transkriptionsfaktoren, die darauf hin im Zellkern die Transkription von Genen als Antwort auf den Stress vorantreiben.

### 1.3.3 Die Funktionen von FoxO im Organismus

Die FoxO Transkriptionsfaktoren binden die DNA über die Forkhead box mit der Sequenz GTAAA(C/T)A. Diese Bindungssequenz erhielt den Namen DBE (DAF-16 family member-binding element) (Furuyama et al., 2000; Weigelt et al., 2001). Durch bioinformatische Analysen wurde eine Vielzahl von Genen entdeckt, die Bindungsstellen (DBE) für FoxO Transkriptionsfaktoren in ihren Promotoren enthalten (Xuan und Zhang, 2005). Die FoxO

Transkriptionsfaktoren sind an einer Vielzahl unterschiedlicher Prozesse im Organismus beteiligt. Dazu gehören die Zellzyklusprogression, die oxidative Entgiftung, die Apoptose, der Glukosemetabolismus und die Zellalterung (Sedding, 2008). Im folgenden Abschnitt werden die für die vorliegende Arbeit relevanten Funktionen von FoxO kurz erläutert.

### 1.) *FoxO und die Zellzyklusregulation:*

In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass FoxO Transkriptionsfaktoren die Genexpression des Cdk-Inhibitors  $p27^{Kip1}$  induzieren können (Medema et al., 2000; Nakamura et al., 2000). Die Steigerung der  $p27$ -Produktion führt zu einem Arrest des Zellzyklus in der  $G_0/G_1$ -Phase durch die Inhibition der Cyclin/Cdk-Komplexe, die zum Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus notwendig sind. Ein anderer Regulationsmechanismus innerhalb der Zellzyklusprogression konnte für FoxO1 gezeigt werden. Experimentell wurde nachgewiesen, dass aktives FoxO1 die Expression von Cyclin D1 und D2 hemmt (Ramaswamy, S. et al., 2000; Schmidt, M. et al., 2002). Durch Hemmung der D-Typ Cycline können die für den Eintritt in die S-Phase notwendigen Cyclin/Cdk-Komplexe für die Inaktivierung des pRb nicht aufgebaut werden. Von besonderer Bedeutung ist ebenfalls der Übergang von der  $G_1$  zur S-Phase und der  $G_2$ -M-Phasen Übergang (Tran, H. et al. 2002). Die FoxO Transkriptionsfaktoren haben somit eine wichtige Funktion an den Kontrollpunkten für die Zellzyklusprogression (Ho et al., 2008).

### 2.) *FoxO in der Antwort auf oxidativen Stress und DNA-Reparatur:*

Die FoxO Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression von Genen, die den Organismus vor oxidativem Stress schützen. Dazu gehören Gene, wie z.B. die MnSOD (Kops, G.J. et al., 2002) und die Katalase (Nemoto und Finkel, 2002). Die MnSOD ist in den Mitochondrien lokalisiert und katalysiert die Reduktion von  $O_2^-$  zu  $H_2O_2$ . Das entstehende  $H_2O_2$  wird dann von der Katalase zu  $H_2O$  und  $O_2$  umgesetzt. FoxO3A beeinflusst die Expression von *GADD45*, einem Gen, das in der Antwort auf zellulären Stress am  $G_2$ -M Kontrollpunkt innerhalb des Zellzyklus und an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt ist (Tran et al., 2002). Die Möglichkeit der Zelle, adäquat auf zellulären Stress mit DNA-Reparaturmechanismen zu reagieren, korreliert im Nematoden *C.elegans* mit Langlebigkeit (Kirkwood und Austad, 2000).

### 3.) *FoxO als „Anti-Ageing-Protein“*

Das Alter ist assoziiert mit einer Zunahme von Krebserkrankungen. Die FoxO Transkriptionsfaktoren stehen an der Schnittstelle des gemeinsamen Pfades zwischen Langlebigkeit und der altersabhängigen Krebsentstehung, da sie die Langlebigkeit von Organismen fördern und zur Tumorsuppression beitragen (Greer und Brunet, 2005; 2008).

Der Alterungsprozess aller Organismen steht unter genetischer Kontrolle und beinhaltet den durch Wachstumsfaktoren gesteuerten PI3K-Akt-FoxO Signalweg (Velasco-Miguel, S. et al., 1999; Guarente und Kenyon, 2000; Holzensberger et al., 2003; Bluher M. et al., 2003). In dem Nematoden *C. elegans* führten Mutationen des Insulin - Rezeptors oder der PI3K, zu einer zwei- bis dreifach längeren Lebensspanne durch die veränderte FoxO Aktivität (Morris, J.Z. et al., 1996; Kenyon, C., 1993). Auch das DAF-16 selbst, als das Homologe des humanen FoxO, steuert in *C.elegans* die Lebensdauer (Furuyama et al., 2000). DAF-16 verfügt wie die humanen FoxO Transkriptionsfaktoren über drei potentielle Phosphorylierungsstellen für Akt. DAF-16 ist ein direktes Ziel der Akt und bringt den Nematoden unter bestimmten Bedingungen wie z.B. in Abwesenheit von Nahrung in ein Überdauerungs-Larvenstadium (Ogg et al., 1997; Braeckman, B.P. et al., 2001). In diesem Tiermodell geht man davon aus, dass oxidativer Stress mit Zellalterung korreliert (Honda und Honda, 2002). Beckman und Ames entwickelten 1998 die Hypothese, dass die Entstehung von freien Radikalen für den Alterungsprozess ausschlaggebend ist (Beckman, K.B und Ames, B.N., 1998). Die FoxO Transkriptionsfaktoren induzieren die Expression von Genen, die für die Neutralisierung von ROS (reactive oxygen species) direkt verantwortlich sind z.B. MnSOD, Katalase und GADD45.

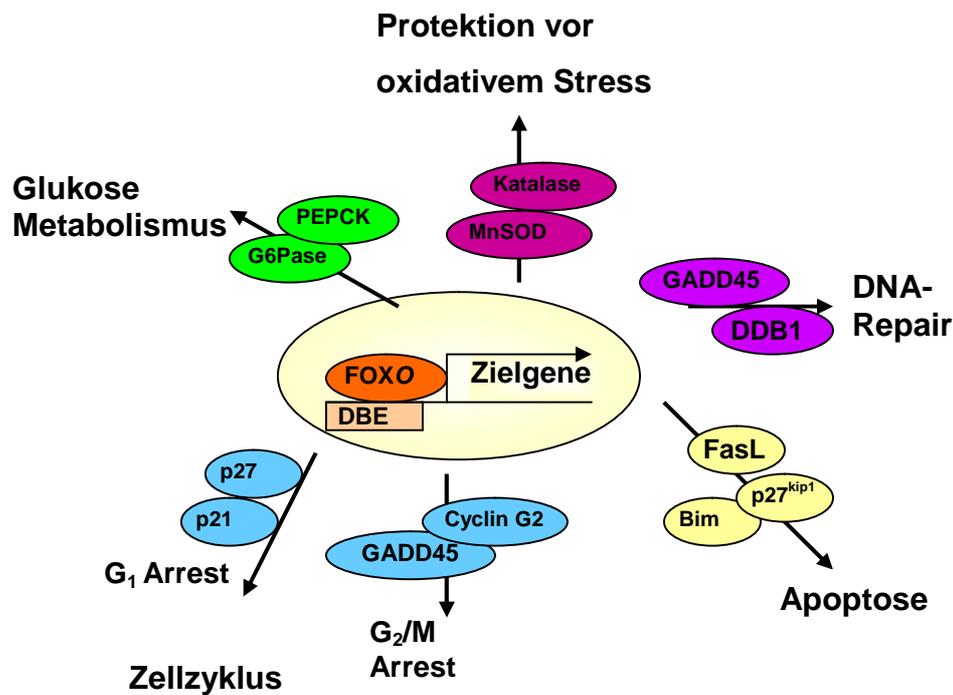
Ebenfalls haben FoxO Transkription einen Einfluss auf den Glukosemetabolismus, Fettstoffwechsel und sind bei der Entstehung von Krebs involviert (Zhang et al., 2006, van der Vos und Coffey, 2008). In epidemiologischen Studien wurde nachgewiesen, dass übergewichtige Menschen eine höhere Mortalität an Krebserkrankungen zeigen als normalgewichtige (Calle et al., 2003). Adipositas zeichnet sich durch eine gestörte insulin-abhängige Signaltransduktion und einen gestörten Glukosemetabolismus aus (Kadowaki et al., 2003). Über Insulin wird der PI3K/Akt/FoxO Signalweg gesteuert zur Aufrechterhaltung der metabolischen Homeostase (Imae et al., 2003). Bestimmte Polymorphismen der FOXO Gene

sind mit einem erhöhten Body mass index (BMI) assoziiert (Kim et al., 2006). Hier stellt sich die Frage, ob die Adipositas und die Tumorentstehung unter Adipositas eine gemeinsame Dysregulation des PI3K-Akt-FoxO Signalweges als Ursache haben.

#### 4.) Die FoxO induzierte Apoptose:

Der FoxO-induzierte programmierte Zelltod scheint über die transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen der FoxO Transkriptionsfaktoren zu verlaufen. Das Todeszytokin Fas Ligand (FasL) wurde als ein Mediator der FoxO-induzierten Apoptose identifiziert (Brunet, A. et al., 1999; Barthelemy, C., 2004). Der Fas L Promotor enthält drei Bindungsstellen für Forkhead Transkriptionsfaktoren (Holtz-Heppelmann et al., 1998). In Neuronen führte die Transkription des Fas Liganden in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren zur Apoptose (Le Niculescu, H. et al., 1999). Die FoxO vermittelte Apoptose kann durch die Induktion von Todeszytokinen über die extrinsische Apoptose verlaufen, aber auch durch die Induktion von proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie (BH3-only Proteine) die Apoptose über den intrinsischen Signalweg initiieren. In hämatopoetischen Zellen wird in Abwesenheit von Zytokinen über FoxO Transkriptionsfaktoren die Expression von *BIM* als proapoptotischem Mitglied der Bcl-2 Familie induziert (Stahl, M., 2002; Dijkers, P.F., 2000; 2002). Der *BIM* Promotor verfügt über zwei konservierte Bindungsstellen für FoxO Transkriptionsfaktoren. Durch den Entzug von NGF konnte in sympathischen Neuronen die durch FoxO3a vermittelte Apoptose ausgelöst werden (Gilley, J. et al., 2003). Ebenso konnte in Neuroblastomzellen durch ein mit 4-OHT aktivierbares FoxO3a Fusionsprotein über die Expression von *Noxa* und *BIM* Apoptose induziert werden (Obexer et al., 2006).

Besonders in Systemen, die einen hohen Zellumsatz haben wie z.B. das hämatopoetische System, führt die stress-induzierte Aktivierung der FoxO Transkriptionsfaktoren zum programmierten Zelltod. Bei Organsystemen, die nicht einer permanenten Zellproduktion unterliegen, führt die stress-induzierte FoxO Aktivität eher zum Zellzyklusarrest und zum Überleben der Zelle. Die Effekte der FoxO Transkriptionsfaktoren sind auch abhängig vom zellulären Kontext und der Reaktion der Zelle auf Signale von außen (z.B. Nährstoffangebot). In Abbildung 4 werden die beschriebenen Funktionen der FoxO Transkriptionsfaktoren zusammengefasst.



**Abb. 4: Einige Zielgene von FoxO und ihre zelluläre Funktion**

p21, cyclin-dependent kinase inhibitor 1A; p27, cyclin-dependent kinaseinhibitor 1B; GADD45, growth arrest and DNA damage-inducible protein 45; FasL, Fas ligand; DDB1, damage-specific DNA-binding protein 1; MnSOD, manganese superoxid dismutase, G6Pase, Glucose-6-phosphatase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; DBE, DAF-16 family member-binding element

#### 1.4 Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist ein maligner Tumor, der sich aus primitiven sympathischen Neuroblasten des sympathischen Nervensystems ableitet und im Säugling- und Kleinkindalter auftritt. Mit einer relativen Häufigkeit von 8,3% gehört das Neuroblastom zu den häufigsten soliden Tumoren bei Kindern. Der Primärtumor befindet sich im Bereich der Nebennieren oder liegt paravertebral im Thorax oder Abdomen. Die 10-Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 61%. Nach dem Internationalen Neuroblastoma Staging System wurden in Abhängigkeit der Tumorgröße und dem Lymphknotenbefall vier Tumorstadien und zusätzlich das 4S-Stadium bei Säuglingen definiert (Henry et al., 2005). Das Neuroblastom ist charakterisiert durch eine große klinische und biologische Heterogenität.

Die Prognose für die Patienten ist von klinischen Parametern, wie dem Alter des Patienten bei Diagnosestellung und dem Tumorstadium abhängig

(Brodeur et al., 1988). Zu den molekularbiologischen Parametern, die ebenfalls die Prognose beeinflussen zählen, z.B. die *MYCN* Onkogen Amplifikation (Seeger et al., 1985) und Chromosomenaberrationen z.B. am Chromosom 1 (Christiansen und Lampert, 1988; Caron et al., 1996) und Chromosom 17 (Brinkschmidt et al., 1998; Caron, H. 1995). Ebenso ist die Heterogenität der Histopathologie der Neuroblastome von prognostischer Bedeutung. Nicht nur das biologische Verhalten der Neuroblastome ist von großer Heterogenität geprägt, sondern auch der Krankheitsverlauf kann von einer progressiv aggressiven Form bis zur spontanen Remission gehen. Dies erschwert die Therapie zusätzlich. Denn es besteht die Gefahr, dass Patienten leicht übertherapiert werden. Deshalb sind genaue Kenntnisse über das Tumorverhalten des Neuroblastoms notwendig, um den betroffenen Patienten gemäß ihrer Erkrankung eine individuelle, maßgeschneiderte Therapie zukommen zu lassen (Schramm et al., 2005).

In Neuroblastomen wurde das *MYCN* Gen als direktes Zielgen von E2F-1 identifiziert (Strieder, V. und Lutz, W., 2003; Kramps et al. 2004). Die Überexpression von *MYCN* ist ein molekularer Marker für eine aggressive Verlaufsform der Erkrankung, die mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patienten einhergeht (Brodeur, 1984). Allerdings erreicht der *MYCN* Status nur eine prädiktive Genauigkeit für den progressiven Krankheitsverlauf von 64% (Schramm et al., 2005). Somit sind weitere molekularprognostische Parameter nötig, um eine Aussage über Therapie und Prognose machen zu können. Ein anderes E2F-reguliertes Gen ist *MAD2*. Auch *MAD2* erfüllt die Funktion eines molekularen Markers, dessen Überexpression ebenfalls mit einer schlechten Prognose für betroffene Patienten korreliert (Hermando, E. et al., 2004). Die *MAD2* Expression ist in Neuroblastomen assoziiert mit der *MYCN* Überexpression oder Amplifikation (Hermando, E. et al., 2004). Anscheinend ist der progressive Krankheitsverlauf der Patienten mit Neuroblastom mit einer erhöhten E2F-Aktivität und einer verstärkten Expression von E2F Zielgenen verbunden. In transgenen Mäusen, die eine dysregulierte E2F-Aktivität zeigen, konnte die Entstehung von primären neuroektodermalen Tumoren, zu denen auch das Neuroblastom zählt, nachgewiesen werden (Olson, M.V. et al., 2007). In diesem Zusammenhang ist es sinnvoll weitere direkte Zielgene von E2F-1 in neuroendokrinen Zellen zu identifizieren, um weitere genetische Marker zu haben, die für die Prognose und Therapie von

Bedeutung sein könnten. Die Suche nach Zielgenen ist durch die Entwicklung von cDNA-Mikroarrays in den 90ziger Jahren, die die Gesamtheit der Gene als Expressionsprofil wiedergeben, sehr einfach geworden. So erhält man mittels einem Genchip den „molekularen Fingerabdruck“ der untersuchten Zellen, der zeigt welche Gene aktiv sind und wie stark.

### **1.5 Fragestellung und Ziel der Arbeit:**

#### **Regulation der *FOXO*-Gene durch E2F-1**

Zur Identifizierung weiterer E2F Zielgene in Neuroblastomzellen, wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Werner Lutz ein cDNA-Microarray mit Neuroblastomzellen, die über ein reversibel aktivierbares E2F-1-ER Fusionsprotein verfügen, durchgeführt (Nowak et al., 2006). In Abhängigkeit des aktivierten E2F-1-ER Fusionsproteins konnte unter vielen Genen unter anderem eine differentielle Genexpression von *FOXO1* und *FOXO3A* nachgewiesen werden. Eine quantitative RT-PCR bestätigte die E2F-1 abhängige Induktion von *FOXO*. Aufgrund der regulatorischen Funktionen von FoxO für das Zellwachstum, die Apoptose und die Antwort auf oxidativen Stress könnte die E2F-1 regulierte Genexpression von *FOXO* eine Bedeutung für die Entstehung von Neuroblastomen haben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, *FOXO1* als ein Zielgen von E2F-1 zu verifizieren.

### **1.6 Die induzierbare systemische Rekombination eines konditionellen Allels in der Maus**

#### 1.6.1 Der Einsatz konditioneller versus konventioneller Mausmodelle

Die Möglichkeit, Mäuse mit genomischen Alterationen, die z.B. zur Inaktivierung eines spezifischen Genes führen (Knock-out), herzustellen, war die Voraussetzung um molekulare und zelluläre Aspekte *in vivo* beim gesunden Organismus und in Krankheitsprozessen untersuchen zu können. Es zeigte sich, dass Gene derselben Gen-Familie oder desselben Signalwegs funktionell redundant sein können und oft multiple Funktionen in der Embryonalentwicklung und später beim erwachsenen Organismus haben. Die

konventionellen Knock-out- Systeme haben bereits die Veränderung des Genoms in ihrer Keimbahn angelegt. Keimbahnmutationen können kompensatorische Faktoren oder Signalwege während der Embryogenese aktivieren. Dies ist ein schwerwiegender Nachteil der konventionellen Mausmodelle. Bei Genen die einen frühen letalen Phänotyp haben, stoßen konventionelle Knock-out-Systeme an ihre Grenzen, da die Analyse der Gen-Funktion beim erwachsenen Organismus durch die Letalität in der Embryonalentwicklung unmöglich ist. Krebserkrankungen beruhen auf einer Inaktivierung von Tumorsuppressorproteinen z.B. bei kolorektalen Karzinomen, Mamma Adenokarzinomen). Keimzellmutationen von Tumorsuppressorgen sind häufig mit einer Letalität in der Embryonalentwicklung assoziiert (*Apc*, *Brca2*) (Jonkers und Berns, 2002). Dadurch ist die Funktionsanalyse von Tumorsuppressorproteinen im Rahmen der sporadischen Krebsentstehung am konventionellen Mausmodell ebenfalls nicht möglich. Die sporadische Krebsentstehung beim Menschen ist die Folge der Akkumulation von Mutationen im Genom von einzelnen somatischen Zellen, (Hanahan und Weinberg, 2000). Die meisten epithelialen Krebserkrankungen, wie z.B. das kolorektale Karzinom, entstehen durch sporadische Mutationen. Nur 10% der am kolorektalen Karzinom Erkrankten haben eine Keimbahnmutation (autosomal-dominant), die zu einem familiären Krebs-Syndrom (z.B. FAP) führt, das sich bereits in der Jugend manifestiert (Herold, 2003). Deshalb muss das ideale Mausmodell mit der sporadischen Tumorentstehung beim Menschen vergleichbar sein, um Ergebnisse des Mausmodells auf den Menschen übertragen zu können. Um die menschliche Krebsentstehung im Mausmodell nachahmen zu können, müssen die Mutationen gewebe-spezifisch und zu flexibel gewählten Zeitpunkten am erwachsenen Organismus induzierbar sein. Diese Möglichkeit bieten die konditionellen Mausmodelle. In diesen Modellen kann liganden-abhängig die Cre-Rekombinase Aktivität induziert werden, die eine Rekombination im Genom auslöst und damit Gene aktivieren oder inaktivieren kann. Das erste konditionelle Knock-out Experiment entstand 1994 (Gu et al., 1994). Mittlerweile existieren über 900 Publikationen, in denen mit Cre-Rekombinase transgenen Mäusen gearbeitet wurde (Schmidt-Supprian und Rajewsky, 2007).

### 1.6.2 Die Tamoxifen induzierbare Cre-Rekombinase

Die Cre-Rekombinase ist ein prokaryontisches Enzym des Bakteriophagen P1 und gehört zu einer Familie von Integrasen. Das 38 kD große Protein katalysiert eine Rekombination zwischen zwei Erkennungsstellen die als loxP-Stellen bezeichnet werden (Hamilton und Abremski, 1984). Das loxP-Element besteht aus einer DNA-Sequenz mit 34 bp. Die 8 bp große Kern-Sequenz des loxP-Elementes wird an den Seiten von jeweils 13 bp umfassenden palindromischen Sequenzen umgeben. Wenn loxP-Elemente, in gleicher Orientierung eine DNA-Sequenz im Genom flankieren, kann die Cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1 in E.coli die entsprechende DNA zwischen den loxP Elementen herausschneiden. Ein mit loxP-Sequenzen flankiertes Gen wird als gefloxtes Gen bezeichnet (Mattaei, 2007).

Um mit Hilfe der Cre-Aktivität in Zellkulturen und Säugetieren Veränderungen im Genom induzieren zu können, wurden liganden-abhängige Cre-Rekombinasen entwickelt. Die Cre-Rekombinase wurde mit einer mutierten Ligandenbindungsstelle des humanen Östrogenrezeptors fusioniert (Cre-ER<sup>T</sup>) (Feil et al., 1997; Indra et al., 1999). Das CreER<sup>T</sup> Fusionsprotein kann nur durch Tamoxifen bzw. seinen Metaboliten 4-OHT, nicht aber durch den endogenen Liganden (17-β-estradiol) in physiologischen Konzentrationen aktiviert werden (Danielian et al., 1993; Fawell et al., 1990; Littlewood et al., 1995). Erst die Bindung von 4-OHT an das CreER<sup>T</sup> Fusionsprotein führt zur Dissoziation von Hsp 90 und bringt das Cre-ER<sup>T</sup> Fusionsprotein in den Nukleus, wo daraufhin die Rekombination initiiert wird (Picard, 1994). Gewebespezifisch und zu gewählten Zeitpunkten kann das CreER<sup>T</sup> in den Mäusen aktiviert werden und Veränderungen im Genom induzieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein RERTn-Cre Mausstamm von Mariano Barbacid verwendet, der eine Tamoxifen induzierbare Cre-Rekombinase ubiquitär exprimiert (Guerra et al., 2003). Die in den RERTn Mäusen vorhandene CreER<sup>T2</sup> Rekombinase mit der Trippelmutation G400V/M543A/L544A wurde in Experimenten mit transgenen Mäusen 10fach sensitiver im Vergleich zur CreER<sup>T</sup> Rekombinase eingestuft (Indra et al., 1999). Die möglichst sensitive effektive Bindung von 4-OHT an die Cre-Rekombinase ist die Voraussetzung für eine effiziente Rekombination in den Mäusen.

### 1.6.3 Pharmakokinetik und – dynamik von Tamoxifen

Tamoxifen gehört zur Gruppe der selektiven Estrogen Rezeptor Modulatoren (SERM) und wurde als eine synthetische, antiöstrogene Substanz, die in der Therapie von Mammakarzinomen als kompetitiver Östrogenrezeptor-Antagonist eingesetzt wird (Lee et al., 2008).

Für die liganden-abhängige Induktion der Cre-Rekombinase wurden Fusionsproteine der Cre-Rekombinase mit einer mutierten humanen Östrogenrezeptor Liganden-Bindungs-Domänen (LBD) hergestellt, die mit einer hohen Sensitivität 4-OHT (Tamoxifen-Metabolit) binden (Feil et al., 1996). Das kationisch-amphiphile Tamoxifen wird nach Aufnahme in den Organismus in Phase I und Phase II Reaktionen in der Leber metabolisiert (Fachinformation Tamoxifen, Firma CT). In der Phase I Reaktion konvertiert Cytochrom P450 Tamoxifen zu den Metaboliten:  $\alpha$ -Hydroxytamoxifen, N-Desmethyltamoxifen (N-desTAM) und 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT). Die bei der Phase I entstehenden Hauptmetaboliten sind N-desTAM und 4-OHT. Der 4-OHT-Metabolit des Tamoxifens wird für die Induktion der CreER<sup>T2</sup> Rekombinase benötigt. Tamoxifen und seine Metaboliten sind zu 98% an Plasmaproteine gebunden (Fachinformation Tamoxifen, Firma CT). Nur freie Metaboliten können an Rezeptoren bzw. CreER<sup>T2</sup> binden. In der Phase II Reaktion der Leber werden die Tamoxifen-Metabolite mit Glucuronsäure konjugiert, um sie als wasserlösliche Produkte über die Galle und den Stuhl auszuscheiden. Tamoxifen wird sehr gut über den Darm resorbiert und kann deswegen zur Induktion der Cre-Rekombinase Aktivität als Tamoxifen-Citrat mit dem Futter über einem vierwöchigen Zeitraum oral gegeben werden (Casanova et al., 2002; Kiermayer et al., 2007). Tamoxifen als freie Base kann in Pflanzenöl gelöst ebenfalls durch eine i.p. Injektion appliziert werden (Hayashi und McMahon, 2002).

## **1.7 Die Aktivierung eines mutierten Gens ( $p300^{As}$ ) durch die Tamoxifen induzierbare systemische Rekombination in der Maus**

### 1.7.1 Die Acetyltransferase p300 - ein potentieller Tumorsuppressor

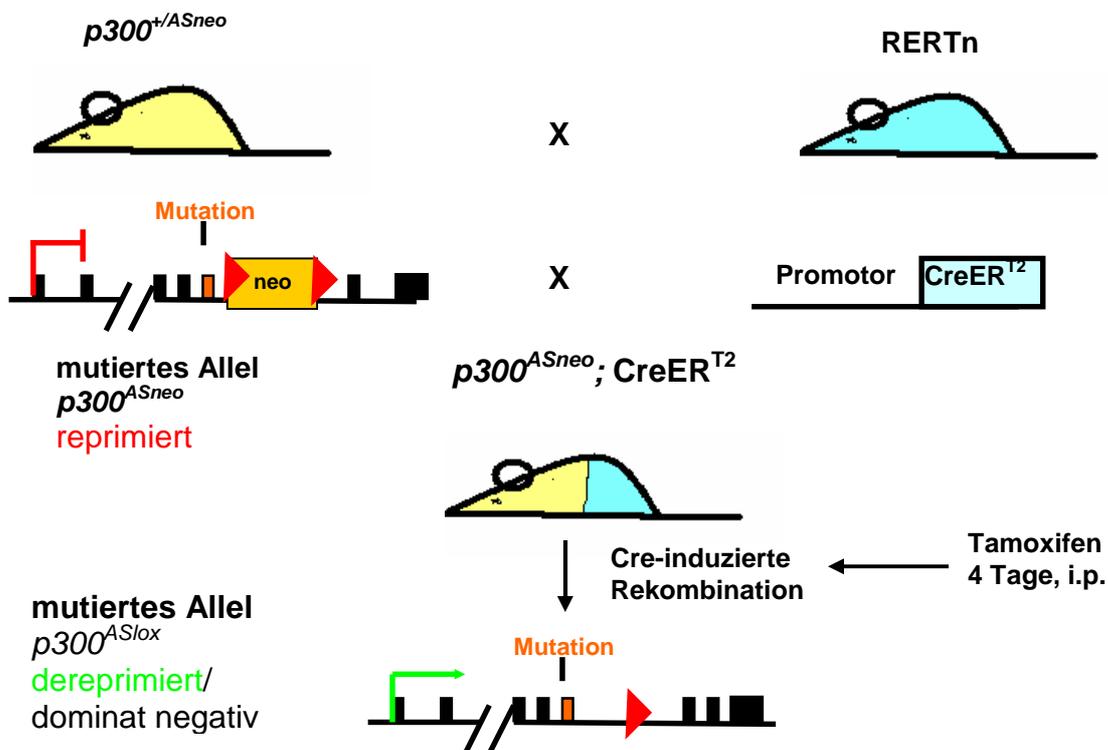
Das 300-kD große Protein (p300) wurde als Interaktionspartner des E1A Proteins von Adenoviren entdeckt (Eckner et al., 1994). p300 und das strukturell und funktionell verwandte CBP regulieren die Genexpression durch

die Interaktion mit nukleären Proteinen und sind bei der Zellzyklus-Regulation, der Differenzierung und Apoptose beteiligt (Goodman und Smolik, 2000; Iyer et al., 2007; Yang und Seto, 2007). Gemeinsam mit dem paralogen CBP ist p300 ein transkriptioneller Koaktivator mit einer Acetyltransferase-Aktivität (Bannister und Kouzarides, 1996; Ogryzko et al., 1996). p300 acetyliert die Histone der DNA und verändert somit die Chromatinstruktur. Aber auch Nicht-Histon-Proteine, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, Rb und p53, werden von p300 acetyliert (Gu und Roeder, 1997; Liu et al., 1999; Martinez-Balbas et al., 2000; Chan und La Thangue, 2001). p300 und CBP sind Tumorsuppressorproteine und können somit durch einen Funktionsverlust an der Entstehung von Tumoren beteiligt sein (Chan und La Thangue, 2001). p300 und CBP sind ebenfalls wie das klassische Tumorsuppressorprotein pRb Ziel von onkoviralen Proteinen (z.B. Adenovirus und Papillomavirus) (Hottinger und Nabel, 2000). Des Weiteren ist p300 bei der Regulation des Tumorsuppressors p53, PTEN und Rb involviert. Z.B. wird bei der Antwort auf zellulärem Stress p53 von p300 acetyliert, was in der Stabilisierung von p53 resultiert (Ito, 2001). Somatische Mutationen im *p300* Gen konnten in epithelialen Tumoren nachgewiesen werden (Muraoka et al., 1996; Kishimoto et al., 2005). Die somatischen Mutationen des *p300* Gens sind mit dem Verlust der Heterozygotie des zweiten Allels verbunden (LOH). Der Verlust der LOH ist charakteristisch für die Tumorsuppressorfunktion. Allerdings sind somatische *p300* Mutationen in Tumoren sehr selten (Gayther et al., 2000). Nach diesen Beobachtungen verhält sich *p300* wie ein klassisches Tumorsuppressorgen, das im Rahmen der mehrstufigen Karzinogenese der epithelialen Tumoren (z.B. kolorektales Karzinom) beteiligt sein könnte (Nowell, 1976).

### 1.7.2 Die induzierbare systemische Derepression des *p300<sup>AS</sup>*-Allels

Um die Frage beantworten zu können, ob die Acetyltransferase-Aktivität von p300 *in vivo* eine Tumorsuppressor-Funktion in den unterschiedlichen Organsystemen hat und somit bei der somatischen Krebsentstehung epithelialer Tumoren eine Rolle spielt, eignet sich sehr gut der Einsatz eines konditionellen Knock-in Mausmodells. Mäuse, die über eine *p300* Mutation in ihrem Genom verfügen (*p300<sup>+/ASneo</sup>*) wurden mit RERTn Mäusen gekreuzt, die ubiquitär über eine Tamoxifen induzierbare Cre-Rekombinase verfügen

(CreER<sup>T2</sup>) (Guerra et al., 2003). Bei dem mutierten  $p300^{AS/neo}$ -Allel wurde durch den Austausch von zwei benachbarten Aminosäuren in der HAT-Domäne des p300 Proteins [WY(1466-1467)AS] die Acetyltransferase-Funktion von p300 inaktiviert (Shikama et al., 2003). Die Anwesenheit eines *neo*-Gens in einem Intron des mutierten Allels führt zur vollständigen Repression des mutierten  $p300^{AS/neo}$ -Allels. Die durch Tamoxifen induzierbare Cre-Rekombinase (CreER<sup>T2</sup>) schneidet die von loxP-Sequenzen flankierte *neo*-Kassette heraus, was zur Derepression des mutierten  $p300^{AS}$ -Allels führt. Durch das Kreuzen von heterozygoten Mäusen für das  $p300^{+/ASneo}$ -Allel mit Mäusen, die ubiquitär die Cre-Rekombinase (CreER<sup>T2</sup>) exprimieren, entstehen doppelt heterozygote Mäuse für  $p300^{+/ASneo}; CreER^{+/T2}$ . In diesen Mäusen kann durch die Gabe von Tamoxifen die Herstellung des mutierten p300 Proteins ( $p300^{AS}$ ) induziert werden, welches eine dominant negative Wirkung hat. Die dominant negative Wirkung des  $p300^{ASneo}$ -Allels zeigt sich darin, dass Mäuse, die heterozygot für ein Null-Allel von p300 sind, keiner bzw. nur mit einer geringen Penetranz einer embryonalen Letalität unterliegen, während Mäuse mit dem mutierten  $p300^{+/ASneo}$ -Allel bereits in der Embryonalentwicklung oder perinatal sterben (Yao et al., 1998; Shikama, 2003). In Abb. 5 ist der Ansatz der Kreuzung der  $p300^{+/ASneo}$  Mäusen mit den RERTn Mäusen und der Aufbau des mutierten  $p300^{+/ASneo}$ -Allels schematisch dargestellt.



**Abb. 5: Tamoxifen induzierte systemische Depression des mutierten  $p300^{ASneo}$ -Allels in der Maus.** Das dereprimierte  $p300^{ASneo}$ -Allel verfügt über keine Acetylase-Aktivität mehr und hat gegenüber dem  $p300$  Wildtyp Protein eine dominant negative Wirkung.

### 1.7.3 Ziel der Arbeit: Die induzierbare systemische Rekombination eines konditionellen Allels in der Maus

$p300^{+/ASneo}$  Mäuse wurden mit RERTn Mäusen gekreuzt. Durch das Ansetzen dieser Kreuzung wurden doppelt heterozygote Mäuse für  $p300^{+/ASneo}; CreER^{T2}$  erhalten. Das Ziel der Arbeit bestand darin zu messen, wie effizient in einem Mausstamm, der ubiquitär ein  $CreER^{T2}$  Fusionsprotein exprimiert, nach Tamoxifen Gabe, die Rekombination des konditionellen mutierten  $p300^{AS}$  Gens stattfindet. Dazu sollte in erwachsenen Mäusen, die doppelt heterozygot für  $p300^{+/ASneo}; CreER^{T2}$  sind, durch eine mehrtägige, tägliche i.p. Injektionen von Tamoxifen die Cre-Rekombinase aktiviert werden, um die Rekombination des mutierten dominant negativen  $p300$  zu induzieren. Nach der Induktion der Cre-Rekombinase Aktivität sollte zu verschiedenen Zeitpunkten die Derepression des mutierten geflochten  $p300^{AS}$ -Allels in unterschiedlichen Geweben in Mäusen mit Hilfe einer allel-spezifischen qRT-PCR überprüft werden.

## 2 Materialien

### 2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden in Analysenqualität von den Firmen Merck, Roth, Sigma und Riedel-de Hahn bezogen. Chemikalien und Material, das von anderen Firmen geliefert wurde, wird in Klammern nach dem jeweiligen aufgeführten Material genannt.

### 2.2 Zellkultur

#### 2.2.1 Vollmedien

- 500 ml DMEN (Bio Whittaker) für U2OS-Zellen
- 500 ml RPMI-1640-Medium (PAA Laboratories) für Neuroblastomzelllinien
- 50 ml FCS (fetales Kälberserum) (Sigma), wärmeinaktiviert ( 30 min. bei 56°C)
- 5 ml Penicillin-Streptomycin (Streptomycin 10.000 U/ml, Penicillin 10 mg/ml; Gibco)
- 5 ml L-Glutamin (200mM; Gibco)

#### 2.2.2 Einfriermedium

- 70% RPMI-1640-Vollmedium (PAA Laboratories)
- 2% FCS (fetales Kälberserum) (Sigma)
- 10% DMSO (Dimethylsulfoxid), (Merck)

#### 2.2.3 Trypsin-EDTA (Gibco)

#### 2.2.4. Selektionsantibiotikum

- G418-Sulfat (Neomycinderivat; (Sigma)  
200 mg/ml in Wasser, verwendete Endkonzentration 200 µg/ml

#### 2.2.5. PBS (Phosphate Buffered Saline)

- 137 nM NaCl
- 3 mM KCl
- 6,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

- pH 7,4 (HCl eingestellt)

### 2.2.6 Zelllinien

- 1A3: Derivat der Neuroblastomzelllinie SK-N-SH-EP. In die Zellen wurde ein mit 4-OHT aktivierbares E2F-1-ER Fusionsprotein eingebracht (C. Kramps et al., 2004).
- U2OS: humane Osteosarkomzelllinie

Die Zelllinien wurden von PD Dr. Werner Lutz zur Verfügung gestellt.

### 2.2.7 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT, Sigma)

Stammlösung 1mM in Ethanol, verwendete Endkonzentration: 200nM,

### 2.2.8 Zellkulturschalen

Petrischalen und andere Einwegartikel für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner und Nunc bezogen.

### 2.2.9 Inkubator

Heraeus BBD 6220, 37°C, CO<sub>2</sub>-Gehalt 5%, relative Luftfeuchtigkeit 96%

### 2.2.10 Sterile Arbeitsbank

Heraeus Instruments Hera Safe

## **2.3 Transfektionen und Luciferase-Reporter-Gen-Assays**

### 2.3.1 Opti-MEM<sup>®</sup> (Gibco)

### 2.3.2 Lipofectin Transfection Reagent<sup>®</sup> (Invitrogen)

### 2.3.3 Plasmide

- Expressionsplasmide in CMV-Promotor basierten Vektoren
  - § pCMV-DP-1: humane *DP-1*-cDNA (Jooss et al., 1995)
  - § pCMV-E2F-1 : humane *E2F-1*-cDNA (Helin et al., 1993)
  - § pCMV-E2F-2: humane *E2F-2*-cDNA (Lees et al., 1993)
  - § pCMV-E2F-HA-3: humane *E2F-3*-cDNA (Krek et al., 1994)

- § pCMV-E2F-HA-4: humane *E2F-4*-cDNA (Ginsberg et al., 1994)
- § pCMV-E2F-HA-5: humane *E2F-5*-cDNA (Lindeman et al., 1997)
- § pCMV-HA-ER-E2F-1 (Kramps et al., 2004)
- § pCMV-eGFP
- § pCMV-lacZ

- pcDNA3-Flag FKHR (Tang et al., 1999)
- pcDNA3-Flag FKHR;AAA (Tang et al. 1999)
- Luciferase Reportergenkonstrukte:
  - FOXO1luc: humaner *FOXO1* Promotor kloniert in die *BglII* und *HindIII* Seite des pGL3 Vektors (s. Kap. 4.3.1)
  - FOXO1mutluc: Mutante des oben genannten Vektors (s. Kap.4.3.3)
  - pGL3-FasL: FasL Promotor, mit Bindungsstelle für Forkhead Transkriptionsfaktoren, in einen pGL3 Vektor in die *BglII* und *HindIII* Seite kloniert (Nakamura et al., 2000)
  - 3x IRS-luc: drei Tandem Kopien des IGFBP-1 IRS Promotors in einem pGL2 Vektor in die *KpnI* und *XbaI* Seite ligiert (Tang et al., 1999)
  - BIMluc: humaner *BIM* Promotor in einem pGL-Basic Luciferase Reporter in die *SacI* Seite ligiert (Bouillet et al., 2001)

- GFP-Fusionsproteine

pcDNA3-GFP-FKHR: Das Insert von pcDNA3-Flag-FKHR wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *XbaI* ausgeschnitten und in ein pcDNA3-GFP Plasmid eingesetzt (Nakamura et al., 2000)

pcDNA3-GFP-FKHR;AAA: Die konstitutiv aktive Mutante wurde ebenfalls mit *BAMHI* und *XbaI* aus dem pcDNA3-Flag-FKHR ;AAA ausgeschnitten und in ein pcDNA3-GFP Plasmid eingesetzt (Nakamura et al., 2000)

Leervektoren:

- pcDNA3 : Eukaryontischer Expressionsvektor mit CMV(Cytomegalievirus)- und T7-Promotor (Invitrogene)
- pCMV

Die Plasmide pcDNA3-FKHR, pcDNA3-FKHR;AAA sowie die pcDNA3-GFP Fusionsproteine sind ein Geschenk von William Sellers an die AG Lutz. Alle anderen benutzten Plasmide wurden von PD Dr. Werner Lutz zur Verfügung gestellt.

#### 2.3.4 Transiente Assays

##### Lysepuffer zur Herstellung von Zelllysaten :

- 100 mM  $K_3PO_4$ , pH 7,8/ 1mM DTT

##### Luciferase-Reportergen-Assay:

- Reaktionspuffer: 25 mM Gly-Gly, pH 7,8 (Sigma)  
10 mM  $MgSO_4$   
2 mM ATP, pH 7,5 (Sigma)
- Luciferin-Substrat-Lösung: 0,2 D(-)-Luciferin-Natriumsalz (Sigma)  
25 mM Gly-Gly, pH 7,8
- Luminat (EG&G Berthold Lumat LB9507)
- Probengefäße (Falcon)

##### Proteinbestimmung nach Bradford:

- Bradford-Reagenzlösung: 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-25 (Sigma)
- 4,75% (v/v) Ethanol
- 10% (v/v) Ortho-Phosphorsäure in  $H_2O$   
filtriert, lichtgeschützte Lagerung
- bovines Serum-Albumin (Fraktion V, Applichem)
- Plastikküvetten
- Inkubator, 37°C , Heraeus
- Spektralphotometer

##### $\beta$ -Galaktosidase-Reportergen-Assay:

- $\beta$ -Galaktosidase –Puffer
  - § 60 mM  $Na_2HPO_4$
  - § 1 mM  $MgSO_4$

- § 10 mM HCl
- § 50 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol

- ONPG-Lösung: o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galaktopyranoside (Sigma)  
6 mg/ml in H<sub>2</sub>O
- Plastikküvetten
- Inkubator, 37°C, Heraeus
- Spektralphotometer

## 2.4 Herstellung von Präparaten zur Fluoreszenzmikroskopie von GFP- Proteinen

- Deckgläschen u. Objektträger (Leica)
- PBS pH 7,4 s. 2.2.5
- 0,1% NP-40 in PBS, pH 7,4
- 0,1 Glycin in PBS, pH 7,4
- 2% Paraformaldehyd in PBS pH 7,4
- Hoechst
- H<sub>2</sub>O
- Mounting Medium
  - § 70% Glycerin
  - § 0,1% Na-Azid in PBS (pH 7,4)

## 2.5 Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene

### 2.5.1 Isolierung zytoplasmatischer RNA

- TRIzol Reagent<sup>®</sup> (Invitrogene)
- Chloroform
- Isopropanol
- 75% Ethanol in DEPC-Wasser
- DEPC-H<sub>2</sub>O (Diethylpyrocarbonate, Sigma)
- Autoklavierte Pipettenspitzen und 1,5 ml Eppendorfgefäße
- Eppendorf-Zentrifuge
- Nanodrop (UV-Spektralphotometer)

### 2.5.2 cDNA-Synthese mit Random primern

- 2 µg RNA
- DEPC-H<sub>2</sub>O
- Mastermix:
  - § 5x First strand buffer (Gibco)
  - § 0,1 M DTT
  - § 2,5 mM dNTP's ( 2'-Desoxynukleosidtriphosphat)-
  - § Mischung, (Roche Diagnostics),
  - § RNAsin (Gibco)
  - § Random primer (Roche)
  - § MoMuLV Reverse Transcriptase
- PCR-Cycler (MWG Biotech)
- PCR Probengefäße 0,2 ml, autoklaviert

### 2.5.3 RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

- qPCR™ Core Kit for Sybr™ Green I (Eurogentec)
  - § Komponenten: 10x Reaktionspuffer
  - 50 mM MgCl<sub>2</sub> Lösung
  - 5 mM dNTP Lösung
  - Hot Goldstar enzyme
  - SYBR Green I 1:2000 in DMSO
- EB Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5 ( QIAGEN)
- Template
- RT-PCR Cycler: ABI prism 7000
- Reaktionsgefäße für RT-PCR

### 2.5.4 Primer

Sequenzen der Primer, die mit dem qPCR™ Core Kit for Sybr™ Green I (Eurogentec) und dem ABI 7000 Cycler verwendet wurden:

- *FoxO1* for: 5'-TGG TCA AGA GCG TGC CCT ACT-3'  
rev: 5'-CCC GCT CTT GCC ACC CTC TG-3'

- *BMI 1* for: 5'-ATT TAG TTC CAG GGC TTT TCA A -3'  
rev: 5'-CTT CAT CTG CAA CCT CTC CTC TAT -3'
- *CCNE 1* for: 5'- AGA CGG GGA GCT CAA AAC TG -3'  
rev: 5'-TCG TCC ACC AGG GCA CCA T -3'
- *S14* for: 5` - GGC AGA CCG AGA TGA ATC CTC -3`  
rev: 5´ - CAG GTC CAG GGG TCT TGG TCC -3´
- *FoxO 1 A* CHIP for: 5´ - GCG GCG GAC CCC GAG GAG -3´  
rev: 5´ - GGC GCG GAG TGG AGG -3´

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech in Ebersberg bezogen. Die lyophilisierten Primer wurden in EB-Puffer (Qiagen) in einer Konzentration von 100 pmol/µl gelöst.

## 2.6 Analyse der Genexpression auf Proteinebene

### 2.6.1 Puffer zur Herstellung von Zelllysaten

- 50 mM Tris (pH 8)
- 150 mM NaCl
- 1% Triton X-100
- 1 mM DTT
- Proteaseinhibitoren:
  - § Aprotinin 5 mg/ml in PBS pH 7,4 (Roche Biochemica)
  - § Leupetin 5 mg/ml in aqua dest. (Roche Biochemica)
  - § Pepstatin A 1 mg/ml in Methanol (Roche Biochemica)
  - § Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 0,2 M in Ethanol (Sigma)

### 2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

- Sammelgelpuffer
  - § 0,5 M Tris/HCl pH 6,8
- Trenngelpuffer
  - § 1,5 M Tris/HCl pH 8,8
- 0,4% (w/v) SDS (Sodium-dodecylphosphate)
- Ammoniumpersulfat APS 10% (w/v) in H<sub>2</sub>O

- TEMED Tetramethylethyldiamin (Gibco)
- 30% (w/v) Acrylamid 4K-Lösung (AppliChem)
- Aqua bidest.
  
- Laufpuffer pH 8,3
  - § 25 mM Tris
  - § 0,2 M Glycin
  - § 0,1% (w/v) SDS
  
- 3x SDS Probenpuffer
  - § 7,5 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol
  - § 15 ml Glycerol
  - § 3 g SDS, SDS -Lösung 2% (w/v) Endkonzentration
  - § 18,75 ml 0,5 M Tris pH 6,8
  - § 50 mg Bromphenolblau (Sigma)
  - § ad 11,75 ml H<sub>2</sub>O
  
- Molekulargewichtsmarker Full Range Rainbowmarker RPN 800 (Amersham)

### 2.6.3 Western-Blotting

- 10x Blotpuffer (1l)
  - § 30 g Tris Base
  - § 112,9 g Glycin
  - § 30 ml 10% SDS
  - § ad 1 l H<sub>2</sub>O
  
- Einfach-Blotpuffer
  - § 10% 10fach-Blotpuffer
  - § 2% Methanol
  - § ad 1 l H<sub>2</sub>O
  
- 10x TBS (Tris buffered saline) 1 l
  - § 24,2 g Tris-Base
  - § 80 g NaCl

§ mit HCl den pH-Wert auf 7,6 einstellen

- Waschpuffer (TBS-T)
  - § 1fach TBS
  - § 0,1% Tween-20-Lösung (Fluka)
  
- Blockierlösung:
  - § 1fach TBS
  - § 0,1% Tween-20
  - § 5% (w/v) Magermilchpulver
  
- Puffer zur Inkubation mit dem Erstantikörper
  - § 1fach TBS
  - § 0,1% Tween-20
  - § 5% (w/v) Magermilchpulver
  - § 5% BSA
  
- Methanol 100%
- PVDF (Polyvinylidendifluorid)- Membran (Millipore Immobilon-P, Transfermembran)
- Whatman-3M Papier
- Entwicklerlösung ECL (enhanced chemiluminescence) plus Western Blotting Detektionssystem (Amersham)
- Film (Amersham Pharmacia Hyperfilm ECL)
- Antikörper:
  - § Phospho-FKHR (Thr24)/FKHRL1 (Thr32) Antikörper (1:1000) (Cell Signaling)
  - § Sekundärantikörper  
α-rabbit antibody, (Amersham), (1:3000)  
conjugated to horseradish peroxidase
  - § α-Cdk2 (Santa Cruz, sc-163)
  
- Elektrophorese-Apparatur (Biorad)
- Tank-Blot-System (Biorad)

## 2.7 Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting)

- 15 ml Polysterolgefäße (Falcon)
- 1fach PBS
- Trypsin
- Zellschaber (Greiner)
- 70% Ethanol
- RNase A
- Stocklösung: 10 mg/ml, Endkonzentration 0,2 mg/ml in PBS
- Propidiumjodid
- Stocklösung: 1 mg/ml
- FACS-Analysen-Röhrchen (Falcon)
- Zentrifuge Eppendorf
- Zentrifuge Heraeus
- FACS-Gerät:

FACS Calibur von BD Bioscience

## 2.8 Materialien zur Klonierung von Plasmiden

2.8.1 Vektor: pGL3-Basic (Luciferase kodierender Vektor)

2.8.2 Primer für die Amplifikation genomischer DNA

Foxo1aBGL2/2 for: 5'-GAA GAT CTC GCC GGC GCC  
TCC ACG CTG GTT-3'

§ Foxo1a HIND3/2 rev: 5'-ACC CAA GCT TGA CGC GGG  
CCG CTT GCT CT-3'

2.8.3 Genomische DNA aus Neuroblastomzelllinien

Zelllinie Kelly

Zelllinie NB-12

2.8.4 PCR zur Amplifikation von genomischer DNA

- Red Taq -Polymerase, 1 U/µl (Sigma)
- Red Taq-10fach Reaktionspuffer (Sigma)
- 10 mM dNTP (Roche Diagnostics)
- PCR Probengefäße (Eppendorf)

- PCR-Cycler (MWG Biotech)
- DMSO
- autoklaviertes H<sub>2</sub>O

#### 2.8.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

- 1 kb DNA ladder (1 µg/µl) (Gibco)
- DNA loading buffer 6x:
  - § 20 g Sucrose (40%)
  - § 0,1 g Bromphenol blue (0,2)
  - § 0,1 g Xylene cyanol (0,2)
  - § 1 ml (0,5 M) EDTA pH 8,0 (10 mM)
  - § Aqua dest. ad 50 ml
- präparative Agarose (Sigma)
- Ethidiumbromid (1% Lösung, Roth)
- steriles Skalpell
- Eppendorf Probengefäße
- TAE Puffer pH 8,0 (Tris/EDTA)
  - § 40 mM Tris-Acetat
  - § 1 mM EDTA
- Gelelektrophorese-Apparatur (Biorad)
- Mikrowelle

Der zur Klonierung verwendete Vektor und die genomische DNA der Neuroblastomzelllinien wurden von PD Dr. Werner Lutz zur Verfügung gestellt.

#### 2.8.6 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten

- Restriktionsenzyme
  - § *Bgl*I (Gibco)
  - § *Xho*I (Gibco)
  - § *Hind*III (Gibco)
- 10fach Puffer: React 2 (10x) (Gibco)
- 0,1% BSA
- RNase A
- autoklaviertes H<sub>2</sub>O

- Wärmeschrank Heraeus

### 2.8.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

- QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
- QIAquick PCR Purifikation Kit (QIAGEN)
- 100% Ethanol
- Isopropanol
- QIAquick Säule
- EB Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) (QIAGEN)
- Zentrifuge Eppendorf

### 2.8.8 Ligation

- T4 DNA Ligase (Roche Applied Science)
- 10x Ligations-Puffer mit ATP (Roche Applied Science)
- autoklaviertes H<sub>2</sub>O
- 4°C Kühlraum

### 2.8.9 Nährmedien zur Bakterienkultur

- LB-Medium (pH 7,0)
  - 10 g Trypton
  - 10 g Hefeextrakt
  - 5 g NaCl
  - 3 g Glucose
- LB-Ampicillin Agar (1 l)
  - 10 g NaCl
  - § 10 g Trypton
  - § 5 g Hefeextrakt
  - § 20 g Agar
  - § ad 1 l H<sub>2</sub>O
  - § pH auf 7,0 einstellen mit 5N NaOH
  - § autoklavieren, abkühlen auf 55°C
  - 10 ml (10 mg/ml) steril-filtriertes Ampicillin

### 2.8.10 Materialien zur Bakterienkultur

- Einweg-Plastikartikel (Petrischalen, Plastikröhrchen) (Greiner)
- Inkubator, 37°C (Heraeus)
- Wasserbad, 42°C

### 2.8.11 Selektionsantibiotika

- Ampicillin 100 µg/ml Endkonzentration (Stocklösung:
- Kanamycin 100 µg/ml Endkonzentration (Stocklösung: 10 mg/ml)

### 2.8.12 Bakterienstamm zur Transformation

- E.coli Bakterienstamm: DH5α,  
*E.coli* FΦ80dlacZΔM15 Δ(lacZYAaegF)U169 DeoR recA1 endA1  
hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>i</sup>, m<sub>K</sub><sup>+</sup>)phoA supE44 λthi-1 gyrA96 r

### 2.8.13 Plasmid-Aufreinigung

- JET star Purifikation System Mini Midi Maxi (Genomed)
- Isopropanol
- 70% Ethanol
- UV-Spektrometer (Nanodrop)
- Speed-Vac
- 10 mM Tris-HCl, pH 7,4
- Zentrifuge, Heraeus

### 2.8.14 Miniprep (Boiling Method)

- STET-Lösung  
8% Sucrose  
50 mM EDTA  
50 mM Tris pH 8  
Autoklavieren, danach 5% Triton zufügen
- Lysozym : Stocklösung 50 mg/ml, Endkonzentration 0,5 mg/ml
- 70% Ethanol
- TE-Puffer (pH 8,0) (Tris/EDTA)  
§ 10 mM Tris/HCl pH 8,0

§ 100 mM NaCl

§ 1 mM EDTA

- Zentrifuge Eppendorf
- Heizblock 95°C

## 2.9 Mutagenese

- QuikChange XL Site-Directed Mutageneses Kit (Stratagene)

§ Pfu Turbo DNA polymerase (2,5 U/μl)

§ pWhitescript™ 4,5 kb control plasmid (5 ng/μl)

Quiksolution

§ dNTP

§ *DpnI* Restriktionsenzym (10 U/μl)

§ XL10- Gold ultrakompetente Bakterien

Genotyp: Tet<sup>r</sup>Δ(m crA) 183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173

endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac The

[F'proAB lacI<sup>q</sup>Z ΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]

§ XL10-β-Mercaptoethanol

§ PUC18 control plasmid (0,1 ng/μl in TE Puffer)

- Primer:

§ FoxO1E2Fmut for 5'- GCG GGC GGG GGG CGG TTC  
TAG ATC CCG TAA GTC G-3'

§ FoxO1E2Fmut rev 5'- CGA CTT ACG GGA TCT AGA ACC  
GCC CCC CGC CCG C-3'

Die verwendeten Primer für die Mutagenese wurden, HPLC aufgereinigt, von der Firma MWG Biotech in Ebersberg bezogen. Das Lyophilisat wurde in aqua dest. in einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst.

- PCR-Cycler MWG Biotech
- PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml (Eppendorf)
- autoklaviertes H<sub>2</sub>O

## 2.10 Material für tierexperimentelle Arbeiten

### 2.10.1 Mausstämme

- $p300^{ASneo}$  (Shikama et al., 2003)
- Rertn-Cre<sup>T2</sup> (Guerra et al., 2003)
- $p300^{+/ASneo}$ ; RERTn

Die Rertn-Cre Mäuse sind ein Geschenk von M. Barbacid an die AG Lutz.

### 2.10.2 Injektion

- 1 ml Spritzen (BD)
- B-d Microlance 25 G 05x16 mm Kanülen orange (BD)
- Tamoxifen free Base (Sigma), 40 mg/ml Olivenöl
- Abs. Alkohol
- Olivenöl (neuco)
- 36°C Wasserbad

### 2.10.3 Organentnahme

- sterile Skalpelle (BD)
- Pinzetten anatomisch, chirurgisch (Firma Kobe, Marburg)
- Scheren (Firma Kobe, Marburg)
- 1ml Insulin-Spritzen mit Kanüle (BD)
- 10 ml Spritzen (Braun Melsungen)
- sterile Petrischalen (Nunc)
- Kryo-Gefäße für Biopsien (Nunc)
- eiskaltes PBS
- Heraeus Zentrifuge
- Eis und Flüssigstickstoff

Die verwendeten Instrumente wurden bei 180°C sterilisiert

### 2.10.4 Homogenisierung von Gewebe

- DEPC- H<sub>2</sub>O
- 70% Ethanol in DEPC- H<sub>2</sub>O
- 50 ml Probengefäße (Falcon)

- Dispergiertstab Ultra-Turrax T25 (Janke + Kunkel, IKA<sup>®</sup> Laobortechnik)

#### 2.10.5 RNA-Isolierung mit TRIzol<sup>®</sup> (s. 2.5.1)

- Glykogen (Invitrogen)

#### 2.10.6 qRT-PCR (s. 2.5.3)

- Primer:

§ *p300 wt screen* : 5' -TGT CAA GCA TCT TTT TGT ACC A -3'

§ *p300 mut screen*: 5' -TGT CAA GCA TCT TTT TGC TAG C-3'

§ *p300 mutex 5*: 5' - GTG TTC ATT TCT TCC GTC CTA-3'

§ *S16 for*: 5' - AGG GCG GAT TTG CTG GTG TG -3'

§ *S16 rev*: 5' - GCT ACC AGG GCC TTT GAG AT-3'

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech in Ebersberg bezogen. Die lyophilisierten Primer wurden in EB-Puffer (Qiagen) in einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst.

### 3 Methoden

#### 3.1 Zellkultur

##### 3.1.1 Zellkulturbedingungen

Die Neuroblastomzelllinien und die U2OS-Zellen wurden in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C, mit einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% und mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 96% kultiviert. Als Vollmedium für die Neuroblastomzellen wurde RPMI-1640 mit dem Zusatz von 10% FCS (fetales Kälberserum), 1% Penicillin-Streptomycin und 1% L-Glutamin benutzt. Der Zellklon der Neuroblastomzelllinie 1A3 erhielt zusätzlich das Selektionsantibiotikum G418-Sulfat in der Konzentration 200 µg/ml. Für die Kultur der U2OS –Zellen wurde DMEM als Vollmedium verwendet, ebenfalls mit dem Zusatz von 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin und 1% L-Glutamin. Die Arbeiten mit den Zelllinien wurden unter einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt.

##### 3.1.2 Passagieren von Zellen

In Abhängigkeit von der Proliferationsrate der Zelllinien, wurden die Zellen zwei bis dreimal wöchentlich zwischen 1:2 bis 1:20 verdünnt und in sterilen Petrischalen mit frischem Medium kultiviert unter den oben genannten Bedingungen. Für die Anlage einer neuen Zellkultur wurde das alte Medium von den Kulturschalen entfernt, und die Kulturgefäße mit 1fach PBS gewaschen, um Medienrückstände zu entfernen. Anschließend wurden die Kulturschalen mit der Protease Trypsin (Trypsin-EDTA-Lösung) behandelt und ca. drei Minuten bei 37°C inkubiert. Nach wenigen Minuten lösten sich die Zellen unter leichtem Klopfen vollständig ab. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden die abgelösten Zellen in frischem Medium resuspendiert und auf sterile Kulturgefäße in den entsprechenden Verdünnungen verteilt.

##### 3.1.3 Aktivierung des E2F-1-ER Fusionsprotein in 1A3-Zellen

Der Zellklon 1A3 der humanen Neuroblastomzelllinie SK-N-SH-EP exprimiert ein E2F-1-ER Fusionsprotein, welches durch Zugabe von 200 nM 4 - OHT

aktiviert wurde. Nach etwa 16 h setzte die E2F-1 induzierte Apoptose ein. Deshalb wurden die Zellen nach 12-stündiger Behandlung mit 4-OHT geerntet.

#### 3.1.4 Auftauen von Zellen

Für die langfristige Lagerung der Zelllinien, wurden die Zellen eingefroren und dauerhaft in flüssigen Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die gefrorene Zellsuspension wurde in einem  $37^{\circ}\text{C}$  warmen Wasserbad aufgetaut und in ein 15 ml Plastikröhrchen (Falcon), in dem 10 ml kaltes Medium vorgelegt wurde überführt. Die Zellsuspension wurde bei 1000 Umdrehungen pro Minute bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 5 min. zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der DMSO-haltige Überstand verworfen und das Zellpellet in frischen Medium resuspendiert und in entsprechende Zellkulturgefäße gegeben.

#### 3.1.5 Einfrieren von Zellen

Für die langfristige Lagerung von Zellen eignet sich Flüssigstickstoff, der eine Temperatur von  $-196^{\circ}\text{C}$  hat. Zum Einfrieren der Zellpopulationen wurde ein Einfriermedium verwendet, das 2 Teile FCS, 2 Teile Kulturmedium und 1 Teil DMSO enthielt. Die Zellen wurden in dieses Einfriermedium überführt und stufenweise auf die Lagerungstemperatur abgekühlt. Dazu wurden 2 Petrischalen (10 cm Durchmesser) mit Zellen, die zu 90% konfluent waren, wie unter 3.1.2 beschrieben, mit Trypsin behandelt und anschließend mit Medium aufgenommen und bei 1000 Umdrehungen pro Minute bei  $4^{\circ}\text{C}$  5 Minuten lang zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das im Röhrchen verbliebene Pellet mit 3 ml Kulturmedium versetzt. Die Zellsuspension wurde dann für 10 Minuten auf Eis gestellt. Nach 10 Minuten wurde die Zellsuspension mit 3ml Einfriermedium vermischt. Jeweils 1ml der Zellsuspension wurde in beschriftete und vorgekühlte Kryo-Röhrchen gegeben. Die Kryo-Röhrchen wurden zunächst für 30 Minuten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und dann über 24 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur langfristigen Lagerung wurden die gefrorenen Zellen in Flüssigstickstoff gelagert.

#### 3.1.6 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit der Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Hierzu wurde zunächst ein angefeuchtetes Deckgläschen auf die Zählkammer fest aufgelegt, so dass „Newton-Ringe“ sichtbar waren. Die zu zählende Zellsuspension wurde in einem definierten Volumen aufgenommen und mit Hilfe einer Pipette in die Zählkammer eingebracht. Die Zellen wurden unter dem Mikroskop bei 200facher Vergrößerung gezählt. Es wurden die Zellen in den Großquadranten der Zählkammer ausgezählt. Die erhaltene Zellzahl wurde durch die Anzahl der Großquadrate dividiert, und um die Anzahl der Zellen pro ml zu erhalten mit  $10^4$  multipliziert.

### 3.2 Transfektionen und Luciferase-Reporter-Gen-Assays

#### 3.2.1 Transiente Transfektionen mit Lipofectin Reagent<sup>®</sup> (Invitrogen)

Für die Analyse von Interaktionen zwischen intrazellulär translatierten Transkriptionsfaktoren mit transfizierten synthetischen Promotoren wurden transiente Assays durchgeführt. Dazu wurden cDNA-haltige Expressionsplasmide mit Luciferase Reporter-Genkonstrukten in die Zellen kotransfiziert. Die erfolgreiche Bindung der transfizierten Transkriptionsfaktoren an den Promotor des Reporter-Gens wurde durch die messbare Luciferase-Aktivität sichtbar.

Die Durchführung der transienten Transfektionen erfolgte mit Lipofectin Reagent<sup>®</sup> nach den Angaben des Protokolls vom Hersteller. Die Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in Petrischalen ausplattiert und in den entsprechenden Vollmedien (siehe 3.1) kultiviert. Die Neuroblastomzelllinie 1A3 wurde unmittelbar vor der Transfektion ohne Selektionsmarker G418 kultiviert. Auf Petrischalen mit 6 cm Durchmesser wurden ca. 150.000 Zellen ausplattiert. Auf 10 cm Schalen, die nach der Transfektion gesplittet wurden, wurden ca. 1 Mio. Zellen ausplattiert. Die einzelnen Bedingungen des Luciferase Reporter-Gen-Assays wurden jeweils als Triplikate angesetzt, um später den Mittelwert und die Standardabweichung der Luciferase-Aktivität bestimmen zu können. Vor der Transfektion wurde das Medium von den Zellkulturschalen entfernt und die Zellen mit 5 -10 ml PBS gewaschen, um Serum- und Mediumrückstände komplett zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen

mit Opti-MEM<sup>®</sup> überschichtet. Die Versuchsbedingungen, die verwendeten Plasmide und die Lipofectinmenge sind in Tabelle 2 aufgeführt. Für eine 6 cm Zellkulturschale wurden 20 µl Lipofectin<sup>®</sup> mit 180 µl Opti-MEM<sup>®</sup> für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Transfektion von 10 cm Zellkulturschalen wurden 60 µl Lipofectin<sup>®</sup> mit 540 µl Opti-MEM<sup>®</sup> für 45 Minuten inkubiert.

Zur Transfektion wurden insgesamt für eine 6 cm Zellkulturschale 5 µg Plasmid-DNA in 195 µl Opti-MEM<sup>®</sup> und für eine 10 cm Zellkulturschale 15 µg DNA in 585 µl Opti-MEM<sup>®</sup> eingesetzt. Der Plasmid-DNA Mix enthielt jeweils das Luciferase Reportergenkonstrukt, Expressionsplasmide und zur Kontrolle der Transfektionseffizienz ein eGFP Plasmid. Zusätzlich wurde ein pCMV-β-Gal (LacZ) Plasmid kotransfiziert, welches in Abhängigkeit der Anzahl transfizierter Zellen Galaktosidase exprimiert. Anhand der photometrisch gemessenen Galaktosidase-Aktivität konnten die Luciferase Werte normalisiert werden. Allerdings beeinflussen die Expressionplasmide der E2F Transkriptionsfaktoren die Galaktosidase-Aktivität, so dass eine Normalisierung der gemessenen Luciferase Werte nicht immer möglich war. In diesen Fällen wurde die Normalisierung anhand der Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Nach 45 Minuten wurde die Lipofectin-Opti-MEM<sup>®</sup>-Lösung mit der Plasmid-DNA gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Lipofectin-Opti-MEM<sup>®</sup>-Plasmid-Gemisch vorsichtig auf die, mit Opti-MEM<sup>®</sup> überschichteten, Zellen pipettiert. 12 h nach der Transfektion wurde das Opti-MEM<sup>®</sup>-Plasmid-Gemisch von den Zellen entfernt und die Zellkulturschalen mit 5-10 ml 1fach PBS gewaschen. Die 6 cm Zellkulturschalen mit den transfizierten Zellen wurden mit 5 ml Vollmedium weiter kultiviert. Die 10 cm Zellkulturschalen mit den transfizierten Zellen wurden in 10 ml Vollmedium in Kultur genommen. Die Transfektionseffizienz wurde nach 24 h fluoreszenzmikroskopisch über die Expression des eGFP Plasmides abgeschätzt. Zellen, die eGFP herstellten, leuchteten grünlich unter UV-Licht.

## Luciferase-Reporter-Gen-Assays

Reporter-Gen-Konstrukt	Expressionsplasmide	$\mu\text{g}$	pCMV-eGFP $\mu\text{g}$	$\beta$ -Gal $\mu\text{g}$	Kulturschale	Lipofectin	Zellzahl	Zelllinie	
FOXO1-luc	2 $\mu\text{g}$	pCMV-E2F-1 bis E2F-5 pCMV-DP-1 Leervektor pCMV	1 $\mu\text{g}$ 1 $\mu\text{g}$ 2 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{g}$	-----	6 cm	20 $\mu\text{l}$	150.000	1A3
FOXO1mut-luc	2 $\mu\text{g}$	pCMV-E2F-1 bis E2F-5 pCMV-DP-1 Leervektor pCMV	1 $\mu\text{g}$ 1 $\mu\text{g}$ 2 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{g}$	-----	6 cm	20 $\mu\text{l}$	150.000	1A3
3x IRS-luc	2 $\mu\text{g}$	pcDNA3-FKHR pcDNA3-FKHR;AAA pCMV-HA-ER-E2F-1 Leervektor pcDNA3	1 $\mu\text{g}$ 1 $\mu\text{g}$ 1 $\mu\text{g}$ 1 $\mu\text{g}$	0,5 $\mu\text{g}$	0,5 $\mu\text{g}$	6 cm	20 $\mu\text{l}$	200.000	U2OS
pGL3-FasL	6,5 $\mu\text{g}$	pcDNA3-FKHR pcDNA3-FKHR;AAA Leervektor pcDNA3	6,5 $\mu\text{g}$ 6,5 $\mu\text{g}$ 6,5 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{g}$	10 cm	60 $\mu\text{l}$	1 Mio.	1A3
Bim-luc	6,5 $\mu\text{g}$	pcDNA3-FKHR pcDNA3-FKHR;AAA pCMVE2F-1 Leervektor pcDNA	3 $\mu\text{g}$ 3 $\mu\text{g}$ 3 $\mu\text{g}$ 3 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{g}$	10 cm	60 $\mu\text{l}$	1,5 Mio.	1A3

**Tab. 2: Zusammenstellung der durchgeführten Luciferase-Reporter-Gen-Assays.**

Diese Tabelle beinhaltet die verwendeten Plasmide und deren Menge. Weiterhin gibt die Zusammenstellung die, zur Transfektion, verwendete Lipofectinmenge und die Zellkulturen an.

FOXO1-luc: humaner FOXO1 Promotor über *Bgl*II, *Hind*III in pGL3-Basic kloniert

FOXO1mut-luc: Mutante des humanen FOXO1 Promotors in pGL3-Basic

3x IRS-luc : 3Tandem Kopien des IGFBP-1IRS Promotors ligiert in die *Kpn*I und *Xba*I Schnittstellen des pGL2 Vektors

pGL3-FasL: forkhead Seite des FasI Promotors in die *Bgl*II, *Nhe*I Schnittstelle des pGL3-promotors eingesetzt, der zusätzlich über einen SV40 Promotor verfügt.

BIM-luc: humaner BIM Promotor über die *Sac*I Seite in einen pGL-Basic Vektor ligiert

### 3.2.2 Herstellung von Zelllysaten

36 h nach der Transfektion wurden aus den Zellen Lysate zur Messung der Luciferase-Aktivität hergestellt. Die Herstellung der Zelllysate für die Reporter-Gen-Assays erfolgte nach der Methode des schnellen Einfrierens und Auftauens („freeze and thaw“). Hierzu wurden zunächst die transfizierten Zellen zweimal mit eiskaltem PBS, zur vollständigen Entfernung von Mediumresten abgewaschen. Auf die Zellen wurde anschließend 200 µl 100 mM Kaliumphosphat -Puffer (pH 7,8, DTT-haltig) gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Zellsuspension wurde unmittelbar nach der Ernte in Flüssigstickstoff schockgefroren. Danach erfolgte ein dreimaliges Einfrieren in Flüssigstickstoff und ein Auftauen im 37°C warmen Wasserbad. Nach dem „freeze and thaw“ Prozess wurden die Zellen 10 Minuten lang bei 14000 rpm und 4°C (Eppendorf Zentrifuge) zentrifugiert. Der Zellüberstand wurde für die Messung der Luciferase-Aktivität, für den β-Galaktosidase-Assay und die Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt.

### 3.2.3 Messung der Luciferase-Aktivität

Es wurden Luciferase Reporter-Gen-Konstrukte in die Zellen transfiziert, die über eine Gensequenz des Enzyms Luciferase verfügen. Die Expression für die Luciferase wird durch Promotoren auf den Reporter-Gen-Konstrukten gestartet. Zusätzlich zu den Reporter-Gen-Konstrukten wurden Expressionsplasmide, die Transkriptionsfaktoren kodieren, transfiziert. Die in den Zellen exprimierten Transkriptionsfaktoren binden an den Promotor des Reporter-Gen-Konstruktes und induzieren auf diese Weise die Bildung der Luciferase. Die Luciferase Photinus-luciferin 4-monooxygenase ist ein 62 kD großes Enzym, welches aus der Glühwürmchenart *Photinus pyralis* stammt und für die biologische Leuchtreaktion der Glühwürmchen verantwortlich ist. Das Enzym Luciferase katalysiert die Oxidation des Substrates D-Luciferin. Die bei dieser Reaktion entstehende Lichtemission im Spektralbereich zwischen 390 und 620 nm wird mit Hilfe eines Luminometers gemessen und als relative Lichteinheiten (RLU: relative light units) angegeben.

Die entstehende Biolumineszenz wird für die Aktivitätsmessung der Reporter gene im transienten Assay ausgenutzt, da die Lichtemission der Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Somit ist die Lichtemission proportional zur Luciferasemenge in der Probe.

Zur Messung der Luciferase-Aktivität wurden 50  $\mu$ l Zelllysat und 350  $\mu$ l Reaktions-Puffer eingesetzt. Jeweils 100  $\mu$ l Substrat D-Luciferin pro Probe für die Luciferase-Reaktion werden vom Gerät automatisch injiziert, und die Intensität der Lumineszenz wird vom Gerät innerhalb von 20 sec gemessen und die gemessene RLU aufgezeichnet.

### 3.2.4 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität

Um Zellproben mit einer unterschiedlichen Transfektionseffizienz miteinander vergleichen zu können, wurde die  $\beta$ -Galaktosidase bestimmt. Für die Bestimmung der Galaktosidase-Aktivität in den Zellen wurde ein pCMV- $\beta$ -Gal (LacZ) Expressionsplasmid in die Zellen transfiziert. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wird über eine Farbreaktion bestimmt, die photometrisch quantifiziert werden kann. Für die Messung wurde 50  $\mu$ l Zelllysat und 750  $\mu$ l  $\beta$ -Gal -Reaktionspuffer in eine Halbmikro-Einmalküvette vorgelegt. Anschließend wurden 100  $\mu$ l ONPG (o-Nitrophenyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) Substrat-Lösung zu den Ansätzen hinzugefügt. Nach dem Durchmischen der Proben wurden die Küvetten für 1-8 h in einem 37°C warmen Wärmeschrank inkubiert. Die Inkubation der Proben erfolgte solange bis eine Gelbfärbung auftrat. Die Messung der Absorption des entstandenen gelbgefärbten Produktes erfolgte mit einem Spektralphotometer bei 420 nm.

### 3.2.5 Proteinbestimmung nach Bradford (M.M. Bradford 1976)

Zusätzlich zu der Normalisierung über die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Der Proteingehalt der Lysate verhält sich proportional zur Anzahl der transfizierten Zellen, solange sich diese in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befinden und noch keine Kontaktinhibition vorliegt.

Die Proteinbestimmung nach Bradford ist eine photometrische Bestimmung, die

darauf beruht, dass Coomassie-Brilliant Blau G250 in saurer Lösung Komplexe mit den kationischen und hydrophoben Seitenketten von Proteinen bildet. Durch die Komplexbildung mit den Proteinen verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 470 nm ohne Proteinbindung zu 595 nm mit Proteinbindung. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. Hierfür wurden 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg, 6 µg und 8 µg BSA (Stocklösung 1 mg/ml) eingesetzt, und jeweils auf 800 µl H<sub>2</sub>O gebracht und mit 200 µl Bradford-Reagenzlösung vermischt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten wurden 2-5 µl Lysat eingesetzt. Die Absorption der Referenzlösungen und der Proben wurde nach Zugabe der Bradford-Reagenz -Lösung bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch bestimmt. Anhand einer Eichgerade konnten die Proteinkonzentrationen der Lysate bestimmt werden.

### **3.3 Transfektion von GFP- Fusionsproteinen**

#### 3.3.1 Transfektion der GFP-Fusionsproteine mit Lipofectin Reagent<sup>®</sup>

Zur Untersuchung der Lokalisation eines bestimmten Proteins in der Zelle, wurden in Neuroblastomzellen GFP-Fusionsproteine transient transfiziert. Vor der Transfektion erfolgte die Aussaat der zu transfizierenden Zellen auf Deckgläschen (13 mm Durchmesser) in 6 cm Petrischalen. Auf eine 6 cm Schale wurden ca. 150.000 Zellen ausplattiert. Für die Transfektion der 6 cm Schale am nächsten Tag, wurden 3 µg des jeweiligen GFP-Fusionsproteins eingesetzt und 2 µg des Leervektors pcDNA3. Die Transfektion wurde wie unter 3.2.1 beschrieben am nächsten Tag durchgeführt. 12 h nach der Transfektion wurde das Transfektionsgemisch entfernt, die Zellen mit 5 ml 1fach-PBS gewaschen und in 5 ml Medium für ca. 24 h weiter kultiviert. Nach 24 h wurde durch Zugabe von 4-OHT für weitere 12 h das E2F-1-ER Fusionsprotein aktiviert. 36 h nach der Transfektion wurden die Zellen für die Herstellung von Mikroskopie -Präparaten fixiert.

#### 3.3.2 Fixierung und Herstellung von Präparaten zur Mikroskopie

Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 2%igem Paraformaldehyd in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die Zellen auf den Deckgläschen wurden zwei mal mit PBS / 0,1% NP-40 gewaschen. Danach wurde eine Kernfärbung mit Hoechst (1: 8000) durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Deckgläschen dreimal mit PBS/0,1% NP-40 gewaschen, um die überflüssige Reagenzlösung zu entfernen. Vor dem Eindecken der Deckgläschen auf Objektträger wurden diese kurz in PBS und H<sub>2</sub>O getaucht. Anschließend wurde die Flüssigkeit von den Deckgläschen abgetropft. Die Einbettung der Präparate erfolgte mit wasserlöslichen Mounting Medium. Zur Auswertung und Dokumentation wurde ein Leica DMIRB Mikroskop mit Kamera (Kappa CF 1/8 FMC CCD) benutzt.

### **3.4. Analyse der Genexpression auf RNA-Ebene**

#### 3.4.1. RNA-Isolierung

Die Gewinnung zytoplasmatischer RNA aus den kultivierten Zellen wurde mit TRIzol Reagent<sup>®</sup> (Invitrogen) durchgeführt. Zellpellets, die von einer 10 cm Zellkulturschale geerntet wurden, wurden mit 1 ml TRIzol<sup>®</sup> versetzt. Es erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, anschließend wurden 0,2 ml Chloroform dazu gegeben. Nach 2-3minütigem Schütteln wurde die wässrige Phase von der organischen Phase durch eine Zentrifugation bei 10.500 rpm für 15 Minuten bei 4°C getrennt. Anschließend erfolgte aus dem wässrigen RNA-haltigen Überstand die Präzipitation der RNA mit 0,5 ml Isopropanol. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde ein RNA-Pellet durch 10minütige Zentrifugation bei 10.000 rpm bei 4°C gewonnen. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml 75%igem Ethanol in DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurde die RNA nochmals bei 6.000 rpm bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Für die sich anschließende cDNA-Synthese wurde das RNA-Pellet in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentration der RNA wurde mit einem Spektralphotometer (Nano drop) bei der Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Reinheit der Nukleinsäurepräparation wurde mit Hilfe des OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> Quotienten überprüft. Zur c-DNA-Synthese wurden nur Proben verwendet, deren Quotient größer als 1,8 war.

### 3.4.2 cDNA-Synthese mit random primer

Für die cDNA-Synthese wurden 2 µg RNA eingesetzt. Mit DEPC-H<sub>2</sub>O wurde die RNA in ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgenommen, und für 1 Minute bei 65°C inkubiert und abgekühlt. Ein Ansatz enthielt jeweils 10 µl 5x First strand Buffer, 5 µl DTT, 5 µl 2,5 mM dNTP's, 0,2 µl RNAsin, 2 µl random primer und 1µl Mo-MuLV Reverse Transkriptase. Das Gesamtvolumen eines Reaktionsansatzes wurde mit 16,8 µl RNase-freien H<sub>2</sub>O auf 40 µl gebracht. Die zuvor bei 65°C für 1 min. denaturierte RNA wurde mit dem Reaktionsansatz vermischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine 50minütige Inkubation bei 37°C und eine weitere Inkubation bei 70°C für 15 Minuten. Die Synthese der cDNA wurde in 0,2 ml PCR-Gefäßen durchgeführt. Die Inkubationszeiten fanden in einem programmierten PCR-Cycler statt. Die langfristige Lagerung der hergestellten cDNA erfolgte bei – 20 °C.

### 3.4.3 Quantitative RT-PCR

Die quantitative RT-PCR eignet sich aufgrund der hohen Sensitivität und Spezifität besonders gut für die Messung von Proben mit geringer mRNA Expression. Zur relativen Quantifizierung der mRNA Expression wurde die komparative Ct-Methode angewendet (Winer et al., 1999; Livak und Schmittgen, 2001). In der real-time PCR wird nicht ein akkumuliertes PCR-Produkt am Ende der Amplifikation dargestellt, sondern die Zykluszahl als cycle threshold (Ct) angegeben. Zur Detektion des amplifizierten RT-PCR-Produktes wurde SYBR Green I verwendet. SYBR Green I ist ein Cyaninfluoreszenz-Farbstoff der mit einer hohen Spezifität mit doppelsträngiger DNA interkaliert und ein Fluoreszenzsignal bei 520 nm emittiert. (Vitzthum et al., 1999, Zipper et al., 2004). Die Stärke des Fluoreszenzsignals korreliert mit der amplifizierten DNA Menge. Primerdimere und andere Artefakte können zu einem unspezifischen Anstieg des Fluoreszenzsignals führen. Deshalb schießt sich nach der Amplifikation eine Schmelzpunktanalyse an, bei der die Temperatur des Reaktionsgemisches in 1°C Schritten von 50°C auf 95°C erhöht wird. Bei der Temperatur, bei der die doppelsträngige DNA schmilzt und der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff von der DNA dissoziiert, kommt es zum

Abfall des Fluoreszenzsignals. Der entstandene Schmelzpunktpeak repräsentiert das spezifisch amplifizierte DNA-Produkt. Das Vorhandensein mehrerer Schmelzpunkte zeigt, dass mehrere unspezifische PCR-Produkte amplifiziert worden sind.

Je größer die Menge an mRNA bzw. durch reverse Transkription umgesetzte cDNA ist, umso kleiner ist der Ct-Wert. Der Ct-Wert gibt die Anzahl von PCR-Zyklen an, die zum Erreichen einer bestimmten Fluoreszenzschwelle notwendig sind. An der definierten Fluoreszenzschwelle ist die neu synthetisierte Menge an DNA in allen Reaktionsgefäßen gleich. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die DNA-Menge im Reaktionsgefäß, wenn von einer 100%igen Effizienz der PCR-Reaktion ausgegangen wird. Das bedeutet, dass ein Unterschied von einem Ct-Wert weniger der doppelten Menge an DNA in der Probe entspricht. Die Ct-Werte liegen in der exponentiellen Phase der Amplifikation. Um die relative Expression für das zu analysierende Zielgen berechnen zu können, wird die Expression des Zielgens zunächst zu der Expression eines endogenen Referenzgens normalisiert ( $\Delta$ Ct-Wert). Der auf diese Weise ermittelte  $\Delta$ Ct-Wert wird dann vom  $\Delta$ Ct-Wert vom Kalibrator wie z.B. einer Probe mit unbehandelten Zellen subtrahiert. Durch die Subtraktion beider  $\Delta$ Ct-Werte wird der  $\Delta\Delta$ Ct-Wert ermittelt. Der relative Expressionsunterschied zwischen der Probe von behandelten Zellen zu mit unbehandelten Zellen (Kalibrator) wird mit der arithmetischen Formel:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  berechnet (Pfaffl, 2004). Diese Berechnungsweise geht von einer 100%igen real-time Effizienz aus, bei der mit jedem Zyklus die DNA Menge verdoppelt wird.

Die RT-PCR wurde in 25  $\mu$ l Ansätzen durchgeführt. Für eine Reaktion wurde 1  $\mu$ l cDNA eingesetzt. Die weiteren Reagenzien wurden aus dem Kit: qPCR<sup>TM</sup> Core Kit for Sybr<sup>TM</sup> Green I von Eurogentec verwendet.

Der Reaktionsmix für eine RT-PCR-Reaktion enthielt:

- 1  $\mu$ l cDNA
- 2,5  $\mu$ l 10x Reaktionspuffer
- 1,75  $\mu$ l 50mM MgCl<sub>2</sub>Lösung
- 1  $\mu$ l 5 mM dNTP -Lösung
- 0,5  $\mu$ l Forward Primer (10 pmol/ $\mu$ l)
- 0,5  $\mu$ l Reverse Primer (10 pmol/ $\mu$ l)
- 0,125  $\mu$ l Hot Goldstar enzyme

0,75 µl SYBR Green (1:2000 in DMSO)

18 µl EB-Puffer (QIAGEN)

Zur Durchführung der Amplifikation wurde das Gerät ABI prism 7000 mit folgendem Programm benutzt: einmaliger Hotstart bei 95°C für 10 Min.

40 Zyklen: 95°C für 15 Sekunden

60°C für 60 Sekunden.

Die Auswertung der RT-PCR wurde nach der komparativen Ct-Methode (Applied Biosystems User Bulletin # 2) durchgeführt. Zur Berechnung der  $\Delta\Delta C_t$ -Werte von humaner cDNA wurde das *S14* Gen als Kalibrator benutzt. Das *S14* Gen kodiert eine kleine Ribosomen-Untereinheit.

### 3.5 Analyse der Genexpression auf Proteinebene

#### 3.5.1 Lysatpräparation für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Herstellung der Lysate erfolgte nach der Methode des schnellen Einfrierens und Auftauens („freeze-and-thaw“). Zunächst wurden die Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen zweimal mit kalten PBS gespült. In 1 ml kalten PBS wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt und in einem 1,5 ml Eppendorf-Probengefäß gesammelt. Durch die sich anschließende Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 min. bei 4°C wurden Zellpellets gewonnen. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets in 50 µl Lysepuffer resuspendiert und für 10 min. auf Eis inkubiert. Zu dem Lysepuffer wurde unmittelbar vor Gebrauch Protease-Inhibitoren und DTT zugefügt. Nach der Inkubation auf Eis wurden die Proben in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei 37°C aufgetaut. Der Prozess des Auftauens und Einfrierens wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000 rpm, 4°C für 5 min. Der auf diese Weise gewonnene Überstand enthält die Proteine. Für die Auftrennung der Proteine in den Zelllysaten mittels SDS-PAGE wurden 50 µg des Lysates eingesetzt. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte nach der Bradford Methode (siehe 3.2.5).

#### 3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Zelllysaten wurde mit der diskontinuierlichen SDS-Gel-elektrophorese durchgeführt (Laemmli, 1970). SDS (Sodium dodecylsulfate) ist ein Tensid, das die Proteine denaturiert. Dabei entstehen Protein-SDS-Komplexe, die nach außen, durch den hydrophilen Teil des SDS, negativ geladen sind. 1 g Protein wird von 1,4 g SDS gebunden (Michow, 1995). Dadurch erhalten die Proteine eine konstante Zahl von elektrischen Ladungen pro Masse. Die Eigenladungen der Proteine werden von den SDS Molekülen überdeckt. Die negativ geladenen Proteine wandern zur Anode. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit abhängig von der Dichte der Matrix und dem Molekulargewicht der Proteine. Kleine Proteine wandern schneller durch die Maschen des Gels, während große Proteine zurückgehalten werden. Auf diese Weise erhält man eine Trennung der Proteine nach ihrer Größe. Als Matrix wurden Polyacrylamid-Gele verwendet. Das Gel entsteht durch die radikalische Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid. Als Radikalstarter für die Polymerisationsreaktion wurde 10%iges APS benutzt, als Polymerisationskatalysator TEMED (Tetramethyldiamin) (Michow, Budin, 1996). Das Gel setzte sich aus einem Sammelgel und einem 15 %igem Trenngel zusammen. Das Trenngel wurde zuerst gegossen und bis zum Abschluss der vollständigen Auspolymerisation des Acrylamids mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte, luftblasenfreie Ebene zu erhalten. Nach Abnahme des Isopropanols wurde auf das Trenngel das Sammelgel gegossen.

Die Proteinproben wurden in einem 3fach SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt, um die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine zu zerstören. Der Probenpuffer enthielt zusätzlich  $\beta$ -Mercaptoethanol, das zur Reduktion der Disulfidbrückenbindungen der Proteine diente. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Proteinmarker mit auf das Gel aufgetragen. Dieser enthält ein Protein-Gemisch mit bekannten Proteingrößen. Anhand des Markers wurde die Größe der Proteine in der Probe bestimmt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 120 V über 1,5 Stunden. Als Elektrolyt-Lösung, um den Stromfluss zu ermöglichen, wurde ein SDS - haltiger Tris-Glycin Puffer eingesetzt.

### 3.5.3 Western-Blotting

Die mit Hilfe des Gels aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Für den elektrophoretischen Transfer auf die Membran wurde ein Tankblotsystem der Firma Biorad benutzt. Dazu wurde die PDVF-Membran zuerst mit Methanol und anschließend mit Transfer-Puffer angefeuchtet, auf das Polyacrylamidgel mit den aufgetrennten Proteinen gelegt, mit Whatman-3M Papier abgedeckt und in die Tank-Blot-Apparatur eingespannt. Die Elektrophorese wurde konstant bei 120 V bei einer maximalen Stromstärke von 400 mA 30 Minuten lang durchgeführt. Der Transferpuffer enthielt Tris-Base, Glycin, 10% SDS und 20% Methanol.

#### 3.5.4 Detektion der aufgetrennten Proteine

Nach dem Transfer der Proteine auf die PDVF-Membran erfolgte die Identifizierung der aufgetrennten Proteine über die Bindung von spezifischen Antikörpern. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch Waschen mit Waschpuffern, die Detergenzien enthalten, entfernt. Zunächst wurden freie Bindungsstellen der Membran, an denen unspezifische Antikörper binden können, blockiert. Dieses wurde mit 5%iger Magermilch in TBS-T für 2 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Zum Blockieren der freien Bindungsstellen auf der Membran wird ein Protein benutzt, das von dem Antikörper nicht erkannt wird, wie z.B. in Magermilch enthaltene Proteine.

Anschließend wurde die Membran bei 4°C über Nacht auf einem Schüttler mit dem Primärantikörper inkubiert. Der Primärantikörper wurde 1:1000 in einer 1fach TBS-Lösung, die zudem 5% BSA und 0,1% Tween-20 enthielt, verdünnt. Schwächer haftende unspezifische Bindungen mit dem Primärantikörper wurden mit mehrmaligen Waschen in TBST-Lösung am nächsten Tag entfernt. Es erfolgte anschließend eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur, auf dem Schüttler, mit dem Sekundärantikörper. Der Sekundärantikörper wurde in einer 1:3000 Verdünnung in der Blockierlösung eingesetzt und richtet sich gegen die Fc-Bereiche des Primärantikörpers. An den Sekundärantikörper ist eine HRP-*horseradishperoxidase* (Peroxidase von Meerrettich) gekoppelt, die Luminol unter Entstehung einer Lumineszenz umsetzt, was zur Schwärzung eines Filmes führt. Die Detektion der Banden wurde mit Hilfe der Peroxidase - Reaktion mit dem ECL plus Westernblotting Detection System (Amersham)

nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

### 3.6 Quantitative PCR zur Quantifizierung von Chromatin-Immunopräzipitationen

Eine Methode, um die direkte Bindung von Proteinen z.B. von Transkriptionsfaktoren an die DNA *in vivo* nachweisen zu können, ist die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP). Das Prinzip der ChIP beruht darauf, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt eine bestehende Protein-DNA-Bindung in der Zelle durch eine Fixierung festgehalten wird. Anschließend können aus dem Chromatin der Zelle durch eine Sonifizierung Protein-DNA-Fragmente gewonnen werden, die mit einem für das gewünschte Protein spezifischen Antikörper präzipitiert werden. Die durch Präzipitation erhaltenen DNA-Fragmente können mit Hilfe von spezifischen Primern für die vermutete DNA-Region über eine PCR nachgewiesen werden.

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden mit bereits von PD Dr. Werner Lutz isolierten Chromatinpräzipitaten quantitative PCR's durchgeführt. Mit Hilfe der qPCR konnte die Bindung von bestimmten Transkriptionsfaktoren an die durch die Primer definierte DNA-Region nachgewiesen werden.

Für Durchführung der quantitativen PCR mit den DNA-Präzipitaten wurde qPCR<sup>TM</sup> Core Kit for Sybr<sup>TM</sup> Green I von Eurogentec nach dem Pippettierschema unter 3.4.3 benutzt. Zur Amplifikation der DNA wurde das ABI 7000 Gerät mit in 3.4.3 aufgeführtem Programm verwendet. Die quantitative PCR nach der komparativen Ct-Methode ausgewertet. Zur Ermittlung der  $\Delta Ct$ -Werte wurde der Input als endogene Referenz verwendet. Die Berechnung der  $\Delta\Delta Ct$ -Werte erfolgte mit der Probe ohne Antikörper (Kalibrator).

### 3.7 FACS Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting)

#### 3.7.1 Prinzip der FACS-Analyse

Zellzyklus-Analysen einer Zellpopulation wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen mit Propidium - jodid (PI), einem DNA - interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, gefärbt und im

Durchflusszytometer gemessen.

Bei dieser Messmethode wird eine Einzelzellsuspension an einem Laserstrahl, mit geeigneter Wellenlänge, vorbei geleitet. Durch hydrodynamische Fokosierung werden die Zellen einzeln in einem definierten Abstand an Photonendetektoren vorbei geleitet. Die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes werden durch den Laser auf ein höheres Energieniveau angehoben und fallen unter Abgabe von Energie, in Photonen, auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück. Die auf diese Weise entstehenden Photonen werden von einem Photonendetektor registriert. Die Menge an registrierten Photonen verhält sich proportional zum DNA-Gehalt von PI gefärbten Zellen. Zusätzlich ergeben sich durch die Lichtbeugung, Lichtstreuung und die Dauer der Passage am Detektor Informationen über die Größe der Zellen und die Granularität des Zytoplasmas der Zellen. In Histogrammen wurde die gemessene Fluoreszenz der Zellen dargestellt. So wurde die prozentuale Verteilung der Zellpopulation in die verschiedenen Zellzyklusphasen sichtbar. Um die Berechnung von Mittelwerten und der Standardabweichung zu ermöglichen, wurde der Versuch in Triplikaten durchgeführt.

### 3.7.2 Fixierung und Färbung der Zellen mit Propidiumjodid

Die Zellen von 10 cm Zellkulturschalen wurden mit 2 ml Trypsin von den Kulturgefäßen abgelöst und bei 1000 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 10 ml PBS gewaschen und nochmals bei 1000 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 200 µl 1fach PBS-Puffer gelöst. Tropfenweise unter Vortexen erfolgte die Zugabe von 3 ml 70%iger Ethanollösung zu der Zellsuspension. Durch diese Fixierung entstand die, für die Messung mittels der Durchflusszytometrie notwendige, Einzellsuspension. Die mit Ethanol fixierten Proben wurden bei 4°C gelagert bis zur Färbung mit PI.

Zur Vorbereitung der Zellen auf die Färbung, wurden diese bei 3000 rpm für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 300 µl 1fach PBS-Puffer resuspendiert. Die in den Zellen noch vorhandene RNA wurde vor der PI-Färbung durch Zugabe von 5 µl RNase A bei

einer 30minütigen Inkubation bei 37°C verdaut. Anschließend wurden die Proben in spezielle Gefäße für die FACS-Analyse überführt und 15 µl PI (Stammlösung 1mg/ml) hinzugefügt. Die Proben wurden bis zur Messung im Dunkeln bei 4°C gelagert.

Für die Messung wurde ein FACS Calibur Gerät von BD Bioscience mit einem 488 nm Argonlaser benutzt. Zwischen 300 und 600 Zellen pro Sekunde wurden detektiert. Um statistisch auswertbare Ergebnisse zu erhalten, wurden von jeder Probe insgesamt 50.000 Zellen gezählt und für die Auswertung im Histogramm dargestellt.

### 3.8 Klonierung, Restriktionsverdau und Ligation von DNA-Fragmenten

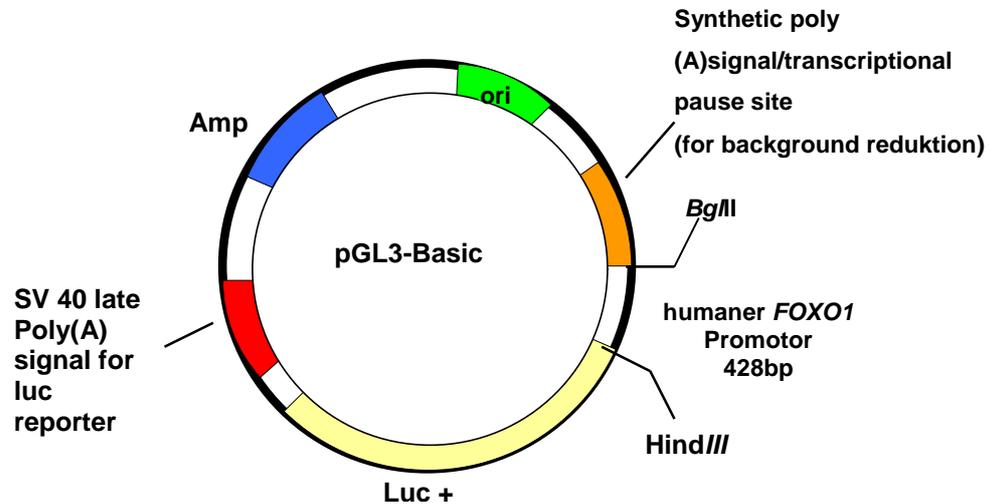
#### 3.8.1 Klonierung eines *FOXO1*-Promotor-abhängigen

##### Reportergenkonstruktes

Zur Durchführung eines Luciferase Reportergen-Assays sollte ein Luciferase Reportergenkonstrukt, welches den humanen *FOXO1* Promotor mit seinen drei Bindungsstellen für E2F Transkriptionsfaktoren enthält in einem pGL3 Vektor kloniert werden.

Die Vektoren, die zum Klonieren benutzt werden, stammen von bakteriellen Plasmiden ab. Der Vektor enthält drei wesentliche Bestandteile, zunächst den Replikationsursprung (*ori*), der für die Vermehrung der Vektoren in den Bakterien Voraussetzung ist. Zusätzlich besitzt der Vektor ein Resistenzgen, dessen Produkt ein Antibiotikum unwirksam macht, um selektiv den Vektor in Bakterien vermehren zu können. Der zur Klonierung des humanen *FOXO1* Luciferase Reportergens (*FOXO1-luc*) verwendete pGL3 Vektor enthält ein Resistenzgen für Ampicillin. Als dritten wesentlichen Bestandteil besitzt der Vektor eine multiple Klonierungsstelle, die aus einem Sequenzbereich von aufeinander folgenden Restriktionsschnittstellen besteht, die auf dem Vektor nur einmal vorhanden sind. In diesem Bereich wird die Fremd-DNA als Insert in den Vektor eingeführt. Als Insert wurde eine 428 bp umfassende Gensequenz des humanen *FOXO1* Promotors über eine *BglIII*; *HindIII* Schnittstelle in den pGL3 Vektor eingefügt. Der pGL3 Vektor kodiert zusätzlich das Enzym Luciferase. Die Luciferase wird in Abhängigkeit einer erfolgreichen Aktivierung

des *FOXO1* Promotors hergestellt. Der pGL3 Vektor ist eine Weiterentwicklung des pGL2 Vektors der Firma Promega, dessen Luciferase im Vergleich zum pGL2 Vektor ein 10fach stärkeres Lumineszenz-Signal abgibt.



**Abb. 6:** pGL3 Vektor ligiert mit dem amplifizierten 428 bp umfassenden humanen *FOXO1* Promotor. Vektor und Insert wurden einem Restriktionsverdau mit den Endonukleasen *BglII* und *HindIII* unterzogen und mit einer T4-Ligase in den pGL3 Vektor ligiert.

### 3.8.2 PCR zur Amplifikation des Inserts mit genomischer DNA

Das humane *FOXO1*-Gen wurde mit einer PCR aus genomischer DNA aus Neuroblastomzelllinien amplifiziert. Die PCR wurde mit einem Cyclyer der Firma WMG Biotech durchgeführt.

Der PCR-Ansatz enthielt: 1  $\mu$ l genomische DNA

1  $\mu$ l Forward Primer (10 pM/ $\mu$ l)

1  $\mu$ l Reverse Primer (10 pM/ $\mu$ l)

5  $\mu$ l 10x Red-Taq-Reaktionspuffer

1  $\mu$ l dNTP

2,5  $\mu$ l DMSO

1  $\mu$ l RedTaq-Polymerase

37,5  $\mu$ l Wasser

Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

Hotstart bei 95°C für 4 Minuten
33 Zyklen: 95°C für 45 Sekunden 67°C für 45 Sekunden 72°C für 90 Sekunden
72°C für 5 Minuten
Abkühlung und Lagerung bei 4°C

### 3.8.3 Gelelektrophorese von PCR-Produkten und Vektoren

PCR-Produkte und Plasmide wurden gelelektrophoretisch mit einem 1%igen bis 2%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Zu 100 ml TAE-Agarosegel wurde im flüssigen Zustand 4 µl einer 1%igen Ethidiumbromidlösung zugefügt. Die Auftrennung erfolgte in einem 1fach TAE-Puffer bei einer Spannung von 130 V. Um die Größe der DNA-Fragmente abschätzen zu können, wurde ein entsprechender Marker mit aufgetragen. Die Proben selbst wurden in einem 6fach DNA-Probenpuffer aufgenommen, um die Beladung des Gel zu erleichtern und die Proben während der Auftrennung sichtbar zu machen. Anschließend wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente über das DNA-interkalierende Ethidiumbromid unter UV-Licht detektiert.

### 3.8.4 Gelextraktion und Aufreinigung

PCR-Banden und Plasmide wurden mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem Qiaquick Gel Extraktionskit (QIAGEN) nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert und aufgereinigt.

### 3.8.5 Verdau mit Restriktionsenzymen

Um das amplifizierte PCR-Produkt als Insert den pGL3 Vektor einfügen zu können, wurde das Insert, welches in den Vektor eingefügt werden soll, und der Vektor mit den gleichen Restriktionsenzymen (*BglIII*; *HindIII*) geschnitten.

Der Ansatz des Restriktionsverdaues war folgendermaßen aufgebaut:

Insert <i>FOXO1</i> Promotor	Vektor pGL3 Vektor
50 µl Insert (27,3 ng/µl)	3 µl Vektor
6 µl React II (10x)	2 µl React II (10x)
2 µl <i>BglIII</i>	2 µl <i>BglIII</i>
2 µl <i>HindIII</i>	2 µl <i>HindIII</i>

Der Restriktionsverdau wurde für 3 h bei 37°C inkubiert.

### 3.8.6 Ligation

Die Ligation von dem geschnittenen Insert und dem Vektor wurde mit einer T4-Ligase mit folgendem Ansatz durchgeführt:

- 1 µl Vektor
- 2 µl Insert
- 1 µl 10x T4-Ligase Puffer mit ATP
- 1 µl T4-Ligase
- 5 µl H<sub>2</sub>O

Die Ligation wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über Nacht bei 4°C gelagert.

### 3.8.7 Transformation in Bakterien

Nach der 16stündigen Inkubation des Ligationsansatzes bei 4°C erfolgte die Transformation des klonierten Vektors in Bakterien. Hierzu wurden zu dem Ligationsansatz 90 µl aufgetaute kompetente *E.coli* Bakterien gegeben. Die Bakterien wurden mit dem Ligationsansatz für 20 Minuten auf Eis gestellt. Der Transformationsansatz wurde anschließend für 1.30 min. in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt und danach wieder kurz auf das Eis gebracht. Anschließend wurde zu dem Transformationsansatz 1 ml LB-Medium gegeben und die Bakterien für 45 Minuten bei 37°C auf einem Schüttler kultiviert. Nach der 45minütigen Inkubationszeit wurden die Bakterien kurz zentrifugiert. Das enthaltene Bakterien-Pellet wurde mit ca. 50 µl LB - Medium auf die Ampicillin -

haltige Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach etwa 18 h wurden die gewachsenen Bakterienkolonien in 5 ml Ampicillin-haltigen LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler weiterkultiviert.

#### 3.8.8 Mini-Prep (Boiling Method)

Aus den Übernachtskulturen im LB-Medium wurden die Plasmide nach der Boiling Methode isoliert. Dazu wurden die Bakterien abzentrifugiert (1200 rpm, 4°C, 5 min.) und das Pellet in 110 µl STET-Puffer mit 0,5 mg/ml Lysozym aufgenommen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach für 1 Minute bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die lysierten Bakterien 15 Minuten bei 13.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit Hilfe von Pipettenspitzen aus dem Probengefäß entfernt. Zu dem Überstand wurde zum Ausfällen der Plasmid-DNA 110 µl Isopropanol gegeben. Die ausgefallene DNA wurde bei 13.000 rpm 15 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 1 ml 70%igen Ethanol gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Pellet erneut abzentrifugiert und in 20 µl TE gelöst.

#### 3.8.9 Restriktionsverdau zur Identifizierung der Plasmide

Die mittels Mini-Prep isolierten Plasmide wurden anschließend einem Restriktionsverdau unterzogen, um nachzuweisen, ob das richtige Plasmid in die Bakterien aufgenommen wurde. Dazu wurden die isolierten Plasmide mit den Restriktionsenzymen *XhoI*, *HindIII* verdaut, und es wurde ein zusätzlicher Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen *BglII*, *HindIII* durchgeführt. Für den Restriktionsverdau wurden 10 µl der Mini-prep, jeweils 1 µl der beiden Endonukleasen und 0,5 µl RNaseA eingesetzt. In Gegenwart des 10x ReactII Puffers fand die Reaktion bei 37°C für ca. 2-3 h statt.

Beim positiven Ausfall des Restriktionsverdaues mit *HindIII* und *BglII* wurde der 428 bp umfassende *FOXO1* Promotor erhalten. Der Kontrollverdau *HindIII* und *XhoI* ergab ein 350 bp großes DNA-Fragment. Klone, die im Restriktionsverdau die entsprechenden DNA-Fragmente aufwiesen, wurden mit einer Maxi-Prep vermehrt. Die Richtigkeit der Gensequenz der klonierten Plasmide wurde mit

Hilfe einer Sequenzanalyse durch die Firma SeqLab (Göttingen) überprüft.

### 3.8.10 Maxi-Prep

Um größere Mengen von Plasmiden mit großer Reinheit zu erhalten wurden, Maxi-Prep's mit dem JETstar Kit der Firma Genomed nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Plasmide wurden nach der Isolierung in 10 mM Tris-Cl Puffer mit einem pH-Wert von 7,0 gelöst. Die DNA-Konzentration der Plasmide wurde mit einem Spektralphotometer (Nanodrop) bei einer Absorption von 260 nm gemessen.

### **3.9. Mutagenese**

Zum Einfügen von Punktmutationen in eine Gensequenz wurde das QuickChange XL Site – Directed Mutagenesis Kit von der Firma Stratagene benutzt. Als Primer für die Mutagenese wurde ein 34-mer Primerpaar konstruiert, welches die gewünschte Punktmutation von vier Basen beinhaltete und eine Schmelztemperatur von 78°C aufwies. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	1 min
2	18	95°C 60°C 68°C	50 sec 50 sec 6 min
3	1	68°C	7 min

Das DNA-Template, welches für die Mutagenese eingesetzt wurde, war das zuvor klonierte *FOXO1-luc* Luciferase Reportergenkonstrukt.

Die PCR wurde mit folgenden Reagenzien durchgeführt:

- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- 1 µl Template (17 ng)
- 1 µl Forward Primer 140 ng (HPLC gereinigt)
- 1 µl Reverse Primer 140 ng (HPLC gereinigt)
- 1 µl dNTP

- 3 µl Quick solution
- 37 µl autoklaviertes Wasser
- 1 µl Pfu Turbo DNA Polymerase (2,5 U/µl)

Die PCR wurde mit der *Pfu Turbo* DNA-Polymerase durchgeführt, die beide Plasmidstränge repliziert. Somit wurde die durch die Primer festgelegte Punktmutation ebenfalls repliziert. Der dadurch entstandene doppelsträngige Vektor wurde anschließend einem Restriktionsverdau mit *DpnI* unterzogen. Die nicht mutierte Plasmid-DNA wird aufgrund ihrer spezifischen dam-Methylierung, der in *E.coli* amplifizierten Plasmide, von der *DpnI* Endonuklease erkannt und verdaut. Somit wird das von den *E.coli* stammende parentale, nichtmutierte Template vollständig entfernt. Nur die mutierte Plasmid-DNA bleibt nach dem Restriktionsverdau erhalten.

Nach dem Verdau wurde das PCR-Produkt in XL-10-Gold ultrakompetente Bakterien nach dem Protokoll des Herstellers transformiert. Die transformierten Bakterien wurden auf Ampicillin-haltige Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Gewachsene Klone wurden anschließend in Übernachtkulturen weiterkultiviert (siehe 3.7.6) und zur Isolierung der Plasmiden genutzt (siehe 3.7.7). Um zu überprüfen, ob die klonierten Vektoren auch die komplette DNA-Sequenz erhalten haben, wurde eine Sequenzierung mit Hilfe der Firma Seqlab in Göttingen durchgeführt. Dazu wurden die Plasmide in 10 mM Tris-Cl pH 7,0 gelöst und in einer Konzentration von 1µg/µl zur Sequenzierung eingeschickt.

### **3.10 Tierexperimentelle Methoden**

#### 3.10.1 Tierhaltung

Für die Versuche wurden erwachsene weibliche und männliche Mäuse doppelt heterozygote Mäuse des Mausstammes  $p300^{A^{Sneo}}$ ;Rertn-Cre verwendet. Die Tiere wurden in konventioneller Haltung in Gruppen (Weibchen u. Männchen getrennt) bis zu 6 Tieren in durchsichtigen Polycarbonatkäfigen (Makrolonkäfigen Typ 3, 810 cm<sup>2</sup>) gehalten. Als Käfigeinstreu wurde staubfreies Weichholzgranulat benutzt. Die Raumtemperatur betrug 22 + 2°C und die relative Luftfeuchtigkeit 55 + 5% unter Einhaltung eines Tag - Nacht -Rhythmus.

Die Mäuse erhielten pelletiertes Alleinfutter und Leitungswasser ad libitum.

### 3.10.2 Induktion der Cre-Aktivität durch Tamoxifen

Die Induktion der Cre-Recombinase Aktivität erfolgte in ab acht Wochen alten doppelt heterozygoten  $p300^{A^{Sneo}}$ ;Rertn-Cre Mäusen durch eine Tamoxifen Injektion i.p. An vier aufeinander folgenden Tagen jeweils zur gleichen Uhrzeit wurden 4 mg Tamoxifen in einem Injektionsvolumen von 100  $\mu$ l Olivenöl i.p. den Mäusen injiziert.

### 3.10.3 Tötung von Versuchstieren, Organentnahme und Gewebeasservation

Nach 10 Tagen (d), 3 Monaten und 6 Monaten wurden die injizierten Tiere durch Cervikaldislokation getötet, um eine Organentnahme durchführen zu können. Der sofortige Eintritt des Todes wurde am Tier durch das Fehlen von Atmung, das Fehlen des Zwischenzehenreflexes und die fehlende Reaktion auf Schmerzreize vor Beginn der Organentnahme überprüft. 23 verschiedene Gewebe/Organe wurden im Rahmen der Organentnahme asserviert und später zur RNA-Isolierung eingesetzt. Da RNA aus den unterschiedlichen Geweben isoliert wurde, wurde die Organentnahme sehr zügig durchgeführt.

Gewonnenes Probenmaterial wurde unmittelbar nach der Entnahme in Flüssigstickstoff eingefroren oder in sterilen eiskalten PBS kurzfristig gelagert.

Die Organentnahme wurde folgendermaßen durchgeführt:

- 1.) Hautschnitt entlang der Linea alba mit einer großen stumpfen Schere vom Os pubis bis zum Unterkiefer.
- 2.) Stumpfes Abpräparieren der Haut von Peritoneum mit seitlichen Entlastungsschnitten
- 3.) Eröffnung des Peritoneums und des Thorax.
- 4.) Beurteilung des Situs auf Organveränderungen.
- 5.) Entnahme des ersten Organpaketes im Thorax: Thymus, Herz, Lunge, Schilddrüse. Die Organe wurden in ihrer Gesamtheit durch Abtrennen der Aorta oberhalb und unterhalb des Herzens entnommen.
- 6.) Entnahme des Verdauungstraktes: Zunge, Speicheldrüsen, Leber, Magen, Pankreas, Duodenum, Kolon.

Der Darminhalt wurde mit ca. 10 ml eiskalten PBS ausgespült.

7.) Entnahme des Urogenitaltraktes: Niere und Nebenniere, Blase, Uterus (♀), Ovar (♀), Hoden (♂), Samenblase (♂).

8.) Entnahme des Gehirns: Großhirn und Kleinhirn.

9.) Entnahme der blutbildenden Organe: Milz, Knochenmark aus dem Femur.

10.) Zur Gewinnung des Knochenmarks wurde der Femur genommen.

Zunächst wurde die Oberschenkelmuskulatur vom Femur abpräpariert. Anschließend wurden beidseits mit einem Skalpell die Epiphysen des Femurs abgetrennt und somit das Knochenmark eröffnet. Das Knochenmark wurde mit einer sterilen Insulinspritze, sowie sterilem eiskalten PBS aus dem Femur gespült und in einer sterilen Petrischale gesammelt. Anschließend wurde das Knochenmark bei 1200 rpm bei 4°C 5 min. lang zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet sofort mit 1ml TRIzol Reagent versetzt und zur RNA-Isolierung (s. 3.4.1) eingesetzt.

11.) Die bei der Isolierung des Femurs durchtrennte und abpräparierte quergestreifte Muskulatur des Oberschenkels wurde ebenfalls als Probe in Flüssigstickstoff asserviert.

12.) Als Hautanhangsgebilde wurde die äußere Ohrmuschel als Probe gewonnen.

Die Gewebegröße der Proben betrug etwa 50 -100 mg. Die entnommenen Gewebe wurden später komplett zur RNA-Isolierung mit TRIzol<sup>®</sup> eingesetzt.

Die Proben wurden nach dem Schockgefrieren in Flüssigstickstoff bis zur Durchführung der RNA-Isolierung bis zu einer Woche bei -80°C in einer Kühltruhe gelagert.

#### 3.10.4 RNA-Isolierung aus Gewebe mit TRIzol<sup>®</sup> und cDNA-Synthese

Die gefrorenen, bei -80°C gelagerten, Organproben wurden zur RNA-Isolierung in den Kryo-Gefäßen leicht angetaut und in einen 50 ml Falcon mit 1 ml TRIzol<sup>®</sup> überführt. Das Gewebe wurde mit einem Ultra-Turrax T25 30 sec. bei Raumtemperatur homogenisiert. Zwischen den einzelnen Proben wurde der Dispergierstab jeweils für 30 sec. mit DEPC - H<sub>2</sub>O, anschließend mit 70 % Ethanol in DEPC-H<sub>2</sub>O und nochmals mit DEPC-H<sub>2</sub>O gereinigt. Um Haare und nicht vollständig homogenisiertes Gewebe voneinander zu trennen, wurden die

Proben nach dem Homogenisieren bei 10.000 rpm bei 4°C 8 min. lang zentrifugiert. Das auf diese Weise gewonnene Pellet enthielt extrazelluläre Membranen, Polysaccharide und hochmolekulare DNA und wurde verworfen. Der Überstand enthielt die RNA und wurde weiter verarbeitet. Fett, das sich an der Oberfläche des RNA-Überstandes sammelte, wurde ebenfalls vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Nach dem Homogenisieren wurden die Proben in TRIzol<sup>®</sup> für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Das Ausfällen der RNA in Isopropanol und das Waschen des RNA-Pellets erfolgte nach demselben Protokoll wie unter 3.4.1 beschrieben. Lediglich 1 µl RNA freies Glykogen wurde pro Probe dem Isopropanol zugefügt, um die ausgefallene RNA nach der Zentrifugation sichtbar zu machen. Die isolierte RNA wurde in DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend sofort zur cDNA-Synthese eingesetzt. Der RNA-Gehalt wurde mit dem Spektralphotometer Nano drop bei der Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Reinheit der Nukleinsäurepräparation wurde über die Bestimmung des OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> Quotienten überprüft. Zur c-DNA-Synthese wurden nur Proben verwendet, deren Quotient größer als 1,8 war. Die cDNA-Synthese wurde wie bereits unter 3.4.2 beschrieben durchgeführt.

#### 3.10.5 Allel-spezifische qRT-PCR und die relative Quantifizierung nach der komparativen Ct-Methode

Die allel-spezifische real-time PCR wurde in 25 µl Ansätzen mit Reagenzien aus dem qPCR<sup>™</sup>Core Kit for Sybr<sup>™</sup>Green I von der Firma Eurogentec mit den PCR-Bedingungen, die unter 3.4.3 aufgeführt wurden, durchgeführt.

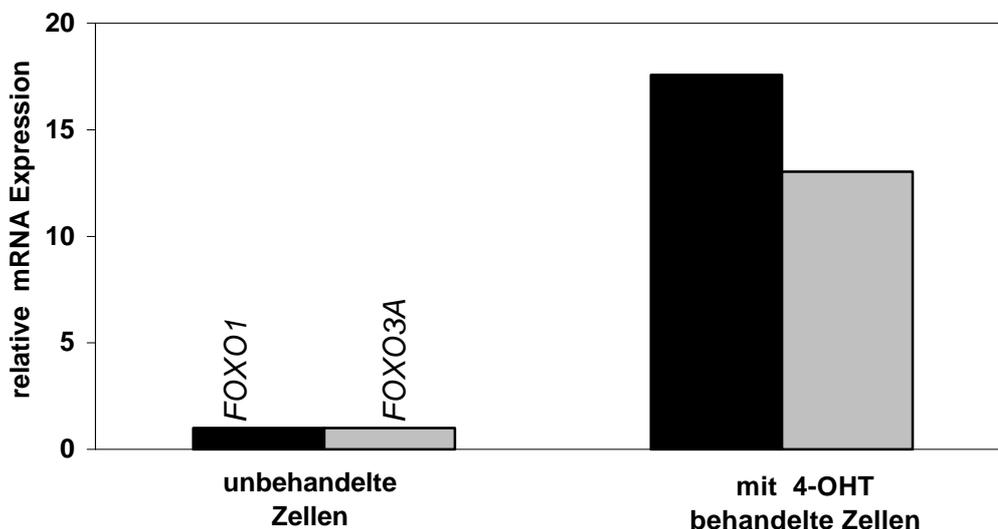
Mit Hilfe der komparativen Ct-Methode wurde die relative mRNA Expression des mutierten *p300* Allels (*p300<sup>AS</sup>*) im Vergleich zum *p300* Wildtyp-Allel in den entnommenen 23 verschiedenen Geweben berechnet. Der Vorteil der komparativen Ct-Methode ist, dass die mRNA Expression der mutierten *p300* Ziel-mRNA direkt mit der mRNA Expression des *p300* Wildtyps verglichen werden kann, ohne dass eine Standardkurve erstellt werden muss. Zur Ermittlung der  $\Delta$ Ct-Werte wurden die Ct-Werte des *p300* Wildtyp-Allels von dem mutierten *p300<sup>AS</sup>*-Allel subtrahiert und zur Berechnung der Ratio eingesetzt. Als endogene Referenz wurde die Expression des *S16* Gens mitbestimmt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 E2F-1 induziert die Genexpression von *FOXO1* und *FOXO3A*

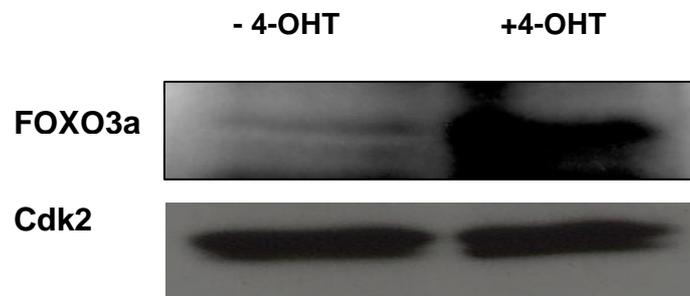
Ziel der Arbeit war es, *FOXO1* und *FOXO3a* als potentielle Zielgene von E2F-1 in Neuroblastomzellen zu verifizieren. Deshalb wurde zunächst auf RNA-Ebene mit Hilfe einer quantitativen RT-PCR die E2F-1 abhängige Induktion von *FOXO1* und *FOXO3A* nachgewiesen. Zusätzlich wurde auf Proteinebene mit Hilfe eines Western-Blots die E2F-1 abhängige Proteinzunahme von FoxO3A analysiert. Die cDNA zur Durchführung der RT-PCR und die Lysate für den Western Blot stammen von der humanen Neuroblastomzelllinie 1A3. Diese Neuroblastomzelllinie ist ein Zellklon der humanen Neuroblastomzelllinie SK-N-SH-EP, in der ein konstitutiv ein E2F-1-ER Fusionsprotein exprimiert wird, welches durch die Anwesenheit von 4-OHT aktiviert wird (Kramps C. et al., 2004).

Die Aktivierung des E2F-1-ER Fusionsproteins in 1A3 Zellen durch 4-OHT erhöhte die RNA-Menge von *FOXO1* etwa 17-fach und von *FOXO3A* ca. um das 13fache (Abbildung 7). Für *FoxO3A* wurde die Induktion durch das aktivierte E2F-1-ER Fusionsprotein in 1A3 Zellen auch auf Proteinebene gezeigt (Abbildung 8 ).



**Abb. 7: E2F-1-ER induziert die Genexpression von *FOXO1* und *FOXO3A*.** 1A3-Zellen, die über ein mit 4-OHT induzierbares E2F1-ER-Fusionsprotein verfügen, wurden für 12 h mit 200 nM 4-OHT behandelt. Aus unbehandelten und mit 4-OHT behandelten Zellen wurde RNA isoliert und durch reverse Transkription in cDNA umgesetzt. Mit der cDNA dieser Zellen wurde

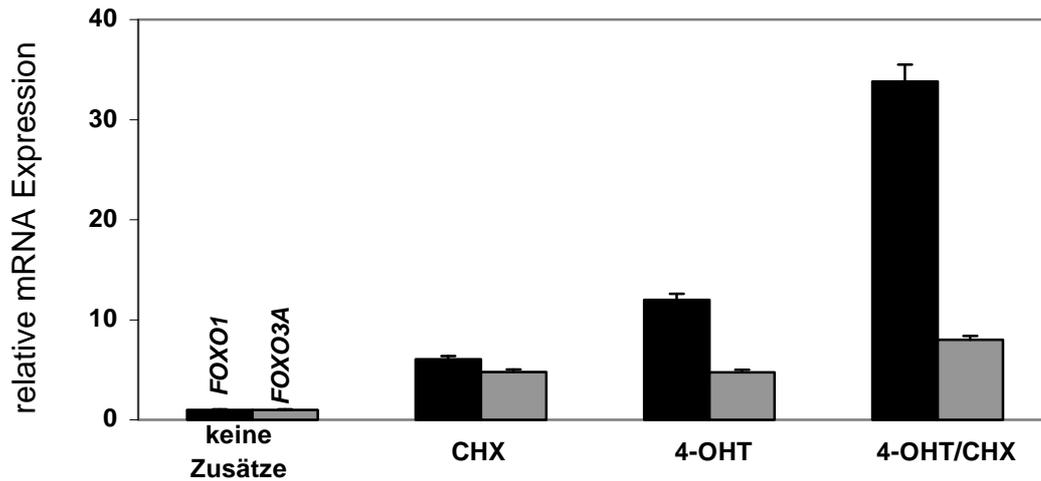
eine qRT-PCR durchgeführt. Die qRT-PCR wurde nach der komparativen Ct-Methode ausgewertet. Als Kalibrator wurde das humane *S14* Gen eingesetzt.



**Abb. 8: E2F-1-ER führt zur Zunahme der Proteinmenge von FoxO3.** Aus 1A3-Zellen, bei denen durch die 12-stündige Gabe von 4-OHT das E2F-1-ER Fusionsprotein aktiviert wurde, wurden Lysate hergestellt. Mittels Immunoblotting konnte ein Anstieg der Proteinmenge von FoxO3A nachgewiesen werden. Als Ladungskontrolle für den Western-Blot wurde Cdk2 verwendet.

#### 4.2 *FOXO1* und *FOXO3A* sind direkte Zielgene von E2F-1

Um zu untersuchen, ob die Expression von *FOXO1* und *FOXO3A* direkt von E2F-1 initiiert wird oder ob die Induktion Zwischenschritte der Proteinbiosynthese benötigt, wurden Neuroblastomzellen mit dem Proteinbiosynthese Inhibitor Cycloheximid (CHX) behandelt. Die Genexpression von *FOXO1* und *FOXO3A* wurde anschließend in mit Cycloheximid behandelten Zellen und unbehandelten Zellen mit einer qRT-PCR nachgewiesen. Cycloheximid verhindert die Translation in eukaryontischen Zellen, da die zur Translation notwendige Peptidyltransferase inhibiert wird. In 1A3-Zellen, die ein mit 4-OHT induzierbares E2F-1-ER Fusionsprotein besitzen, wurde über die Zugabe von 4-OHT das E2F-1-ER Fusionsprotein aktiviert (s. 3.1.3). Zusätzlich wurden die Neuroblastomzellen mit Cycloheximid behandelt. Aus unbehandelten, mit 4-OHT behandelten, mit Cycloheximid behandelten Zellen und aus Zellen, die mit beiden Reagenzien behandelt wurden, wurde RNA isoliert, die zur cDNA-Synthese eingesetzt wurde. (Die cDNA wurde von PD Dr. Werner Lutz zur Durchführung der qRT-PCR zur Verfügung gestellt). In Abb.9 ist das Ergebnis der RT-PCR dargestellt.



**Abb. 9: FOXO1 und FOXO3A sind direkte Zielgene von E2F-1.** Die Induktion von FOXO1 und FOXO3A in Abhängigkeit des E2F-1-ER Fusionsproteins benötigt keine Proteinbiosynthese. Das E2F-1-ER Fusionsprotein in 1A3-Zellen wurde durch die 12-stündige Gabe von 4-OHT aktiviert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Cycloheximid behandelt. Die aus der isolierten RNA durch reverse Transkription hergestellte cDNA der Zellen wurde für die RT-PCR eingesetzt. Die Auswertung der RT-PCR erfolgte nach der komparativen Ct-Methode. Die endogene Referenz ist die Probe ohne Cycloheximid und 4-OHT. Als Kalibrator wurde das humane S14 Gen benutzt. Im Diagramm dargestellt ist die berechnete mRNA Expression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

Die qRT-PCR zeigte, dass die Genexpression von FOXO1 in Anwesenheit des aktivierten E2F-1-ER Fusionsproteins 34-fach stärker war als in der Probe ohne 4-OHT. In Gegenwart des aktivierten E2F-1-ER Fusionsprotein zeigte sich mit dem FOXO3A-Primer eine 12-fache stärkere Expression im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings führte die alleinige Zugabe von Cycloheximid zu einer 6-fach höheren Expression im Vergleich zur Kontrollprobe. Cycloheximid erhöht alleine ebenfalls die Expression beider FOXO-Gene. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass durch die Blockierung der Proteinbiosynthese die Bildung eines Repressors von FOXO1 und FOXO3A unterdrückt wird.

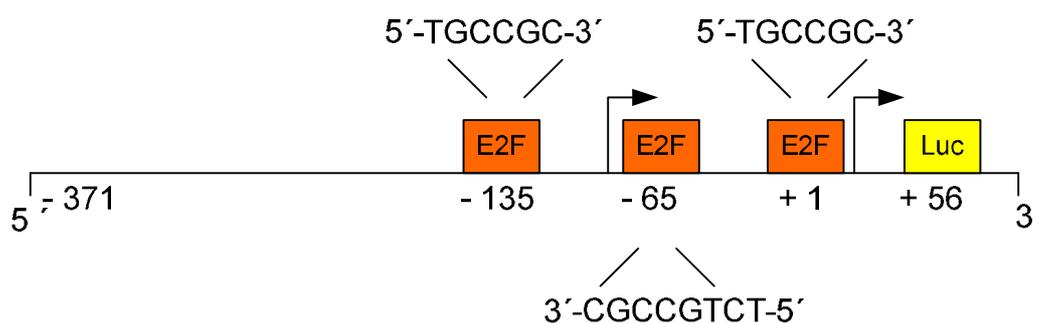
Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Genexpression von FOXO1 und FOXO3A direkt durch E2F-1 initiiert wird, ohne dass andere Proteine, deren Synthese erst durch E2F-1 eingeleitet wird, nötig wären.

### 4.3 Aktivierung des *FOXO1* Promotors durch E2F

#### 4.3.1 Der humane *FOXO1* Promotor enthält potentielle E2F-Bindungsstellen

Der humane *FOXO1* Promotor enthält drei potentielle Bindungsstellen für E2F Transkriptionsfaktoren. Eine E2F-Bindungsstelle liegt in unmittelbarer Nähe zum Transkriptionsstart des *FOXO1* Promotors, eine weitere auf dem komplementären DNA-Strang bei - 65, vom Startpunkt der Transkription aus gerechnet. Eine dritte potentielle Bindungsstelle für E2F befindet sich, vom Transkriptionsstart aus gesehen, bei -135 (Abb. 10).

Um die Aktivierung des *FOXO1* Promotors durch E2F in Neuroblastomzellen analysieren zu können, wurde ein Luciferase Reportergenkonstrukt kloniert, welches die Gensequenz des humanen *FOXO1* Promotors enthält. Dazu wurde eine durch Primer festgelegte, 428 Basenpaare umfassende Gensequenz des humanen *FOXO1* Promotors aus genomischer DNA der Neuroblastomzelllinien Kelly und NB-12 mit Hilfe einer PCR amplifiziert und als Insert in die *BglIII/HindIII* Schnittstelle eines pGL3-Vektors ligiert (Kapitel 3.7.1, Abb.6). Die folgenden Experimente wurden mit dem klonierten *FOXO1luc* Reportergenkonstrukt durchgeführt, welches den amplifizierten *FOXO1* Promotor der Neuroblastomzelllinie Kelly beinhaltet. Das amplifizierte *FOXO1* Promotorfragment ist in beiden Zelllinien gleich.



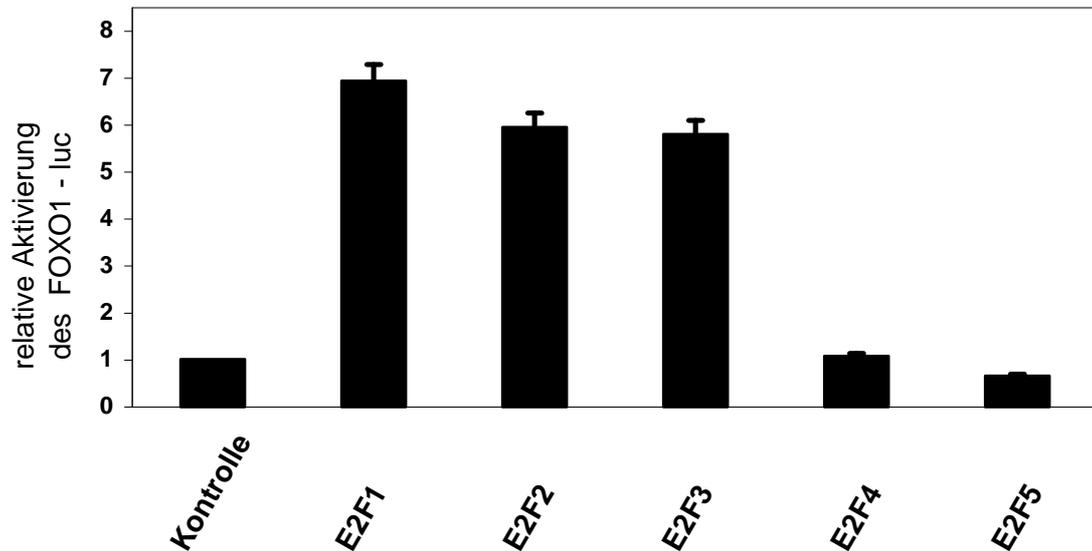
**Abb. 10: Promotor des humanen *FOXO1* Gens mit drei potentiellen Bindungsstellen für E2F.** Die Pfeile markieren Transkriptionsstartpunkte. Das *FOXO1* Gen verfügt über mehrere Transkriptionsstartpunkte von denen zwei der aktivsten eingezeichnet sind. (Davis et al., 1995). Der als Insert 428 bp große humane *FOXO1* Promotor umfasst die Sequenz von - 371 bis + 56 relativ zum Haupttranskriptionsstartpunkt.

#### 4.3.2 E2F aktiviert den humanen *FOXO1* Promotor im transienten Assay

Um die Aktivierung des *FOXO1* Promotors durch E2F zu untersuchen, wurde mit dem klonierten *FOXO1* Luciferase Reporter gen (*FOXO1-luc*) ein transienter Assay durchgeführt. Die Transkriptionsfaktoren E2F-1 bis E2F-5 und der E2F-Dimerisierungspartner DP-1 wurden als Expressionsplasmide zusammen mit dem *FOXO1-luc* Reporter genkonstrukt in die Neuroblastom-Zelllinie 1A3 kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde die Luciferase-Aktivität in den Zelllysaten gemessen.

Die Transkriptionsfaktoren E2F-1, E2F-2 und E2F-3 aktivierten den humanen *FOXO1* Promotor, während E2F-4 und E2F-5 nicht in der Lage waren, das *FOXO1-luc* Reporter genkonstrukt zu aktivieren (Abb. 10).

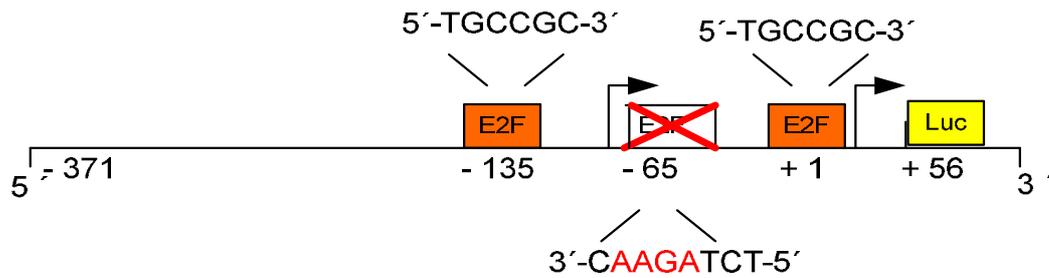
Durch Überexpression von E2F-1 kam es zu einer 7-fachen Aktivierung des *FOXO1*-Promotors. E2F-2 und E2F-3 zeigten jeweils eine 6-fache Aktivierung des *FOXO1* Gens. Bei E2F-4 und E2F-5 erreichte die Luciferase-Aktivität lediglich das Niveau des pCMV-Leervektors.



**Abb. 11: E2F aktiviert den humanen *FOXO1* Promotor.** 1A3-Zellen wurden mit einem humanen *FOXO1*-Luciferase Reporter gen (*FOXO1-luc*), Expressionsplasmiden für E2F-1 bis E2F-5 und dem E2F-Dimerisierungspartner DP-1 kotransfiziert. Für die Transfektion wurden je 1 µg der Expressionsplasmide für E2F-1 und DP-1, 2 µg des *FOXO1-luc* Reportergens und 1 µg eGFP eingesetzt. Als Kontrolle diente ein pCMV-Leervektor. Nach 24 h wurde die Transfektionseffizienz anhand der eGFP Expression abgeschätzt. Ca. 20% der Zellen zeigten eine GFP- Expression bei Mikroskopie unter UV-Licht. Aus den Zellen wurden nach 48 h Lysate hergestellt und die Luciferase-Aktivität gemessen. Auf dem Diagramm ist die mit einer Proteinbestimmung nach Bradford normalisierte relative Aktivierung der *FOXO1* Promotors in Relation zu dem pCMV-Leervektor dargestellt.

#### 4.3.3 Mutagenese einer E2F-Bindungsstelle im *FOXO1* Promotor

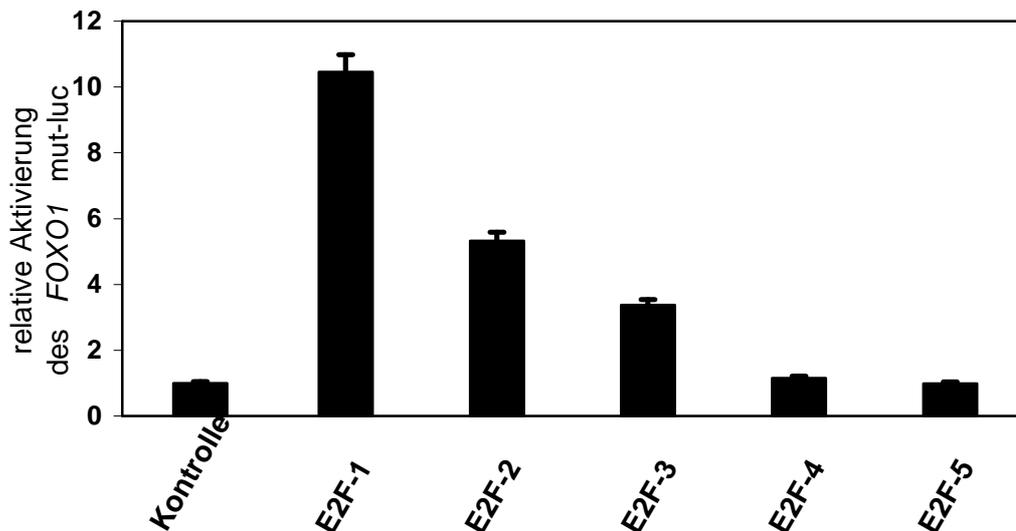
Nachdem die Bindung der aktivierenden E2F Transkriptionsfaktoren an den *FOXO1* Promotor des *FOXO1luc* Reporter genkonstruktes nachgewiesen werden konnte, sollte im folgenden Versuch analysiert werden, ob die E2F-Bindung an den *FOXO1* Promotor abhängig ist von den potentiellen E2F-Bindungsstellen im *FOXO1* Promotor. Deshalb wurde eine der E2F-Bindungsstelle des *FOXO1* Promotors, die Bindungsstelle an Position -65, durch das Einfügen von Punktmutationen in ihrer Funktion zerstört. Diese Bindungsstelle wurde ausgewählt, weil ihre Sequenz am besten mit der Sequenz der Konsensus E2F-Bindungsstelle übereinstimmt. Über eine Mutagenese wurden im *FOXO1-luc* Wildtyp Reporter genkonstrukt vier aufeinander folgende Basen in dieser potentiellen E2F - Bindungsstelle ausgetauscht (Abbildung 12).



**Abb. 12: FOXO1 Promotor mit mutierter E2F Bindungsstelle (FOXO1mut-luc).** Die vier rot markierten Basen der potentiellen E2F Bindungsstelle in 3'-Richtung bei -65 zeigen die vier ausgetauschten Basen. Durch Einführung einer Mutation wurde die ursprüngliche Sequenz bei -65 von 3'-GCCG-5' zu 3'-AAGA-5' verändert. Dies führt zum Verlust der E2F-Bindungsstelle.

#### 4.3.4 E2F aktiviert mutierten FOXO1 Promotor im transienten Assay

Mit dem mutierten Luciferase Reportergenkonstrukt (*FOXO1mut-luc*) wurde ein transienter Reporter-Assay durchgeführt. Die Transkriptionsfaktoren E2F-1 bis E2F-5 wurden als Expressionsplasmide zusammen mit dem E2F-Dimerisierungspartner DP-1 mit jeweils 1 µg kotransfiziert. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde zusätzlich ein eGFP Plasmid in die Zellen transfiziert. 20% der transfizierten Zellen konnten nach 24 h als GFP-positiv eingestuft werden. Zwei Tage nach der Transfektion wurden Lysate gewonnen, die zur Messung der Luciferase-Aktivität eingesetzt wurden.



**Abb.13: E2F aktiviert das FOXO1mut-luc Reporterogenkonstrukt.** In 1A3-Zellen wurden das FOXO1mut-luc Luciferase Reportergen, die Expressionsplasmide E2F-1 bis E2F-5, der E2F - Dimerisierungspartner DP-1 und ein eGFP Plasmid transfiziert.

Das FOXO1mut-luc Reportergen kodiert den humanen FOXO1 Promotor, bei dem eine E2F-Bindungsstelle durch den Austausch von vier Basen nicht mehr funktionsfähig ist. Als Kontrolle wurde ein pCMV-Leervektor transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die RLU-Werte der Luciferase-Aktivität gemessen. In der Abbildung sind die, mit Hilfe der Proteinbestimmung nach Bradford, normalisierten RLU-Werte im Verhältnis zur Basalaktivität des Reportergens als Balkendiagramm dargestellt. Im Experiment wurden Triplikate der einzelnen Bedingungen verwendet, um die statistische Auswertung durchzuführen.

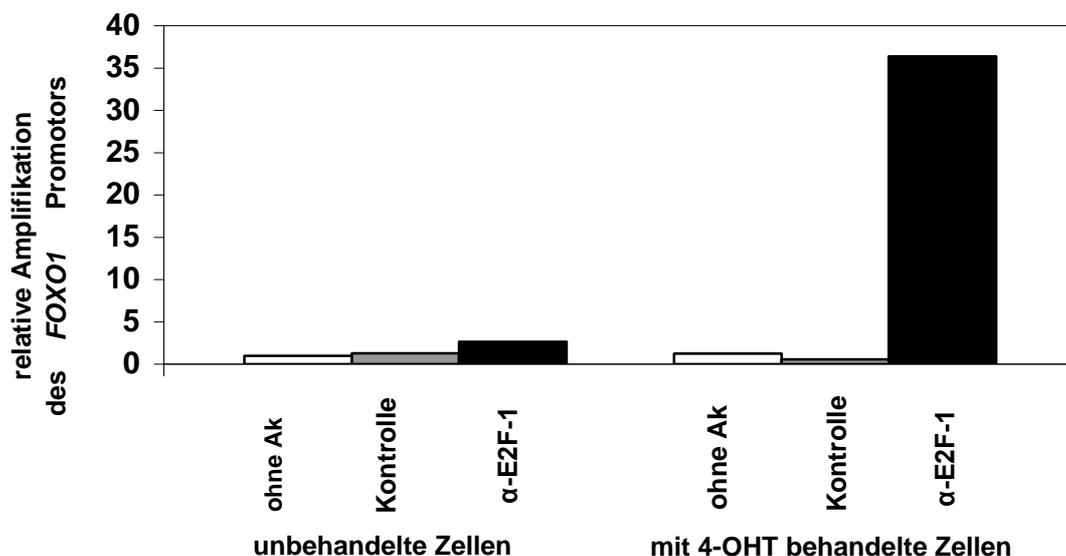
Der mutierte FOXO1 Promotor wurde von E2F-1, E2F-2 und E2F-3 um das 10-fache, 5,3-fache bzw. 3,7-fache aktiviert (Abb. 13). Die Ansätze mit E2F-4 und E2F-5 entsprachen der Basalaktivität des eingesetzten Reportergenkonstruktes.

Somit führt das Fehlen von nur einer der drei möglichen E2F Bindungsstellen im Kontext eines Reporterkonstrukts nicht zu einer verminderten Aktivierung des Promotors durch E2F-Proteine. Auf eine weitere Mutagenese der beiden anderen Bindungsstellen im FOXO1 Promotor wurde verzichtet, da eine E2F Bindungsstelle sich im Bereich des Transkriptionsstartpunktes befindet und eine Mutation dieser Bindungsstelle würde den Transkriptionsstart beeinflussen und damit u.U. die Transkription des FOXO1 Gens in E2F-unabhängiger Weise beeinträchtigen. Ein Rückschluß auf die Rolle dieser Bindungsstelle für die Aktivierung durch E2F-1 wäre dann nicht mehr möglich.

#### 4.4 E2F bindet den *FOXO1* Promotor *in vivo*

##### 4.4.1 E2F-1-ER bindet den *FOXO1* Promotor *in vivo*

In dem vorausgegangenen Reporteragen-Assay konnte mit dem klonierten *FOXO1-luc* Reporterkonstrukt bereits die Bindung von E2F an den *FOXO1* Promotor im Kontext eines Reporterassays nachgewiesen werden. Für den Nachweis der Bindung von E2F an den *FOXO1* Promotor *in vivo* wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) mit einem für E2F-1 spezifischen Antikörper mit der Neuroblastomzelllinie 1A3 durchgeführt. Mit der DNA, die aus dem isolierten E2F-DNA-Komplex stammte, wurde zur relativen Quantifizierung der Bindung von E2F-1 an den *FOXO1* Promotor eine quantitative PCR durchgeführt. Die zur ChIP verwendeten Primer amplifizieren einen Bereich des *FOXO1* Promotors, der den Transkriptionsstart beinhaltet. Die DNA der isolierten Chromatinpräzipitate wurde von PD Dr. Werner Lutz zur Durchführung der PCR zur Verfügung gestellt.

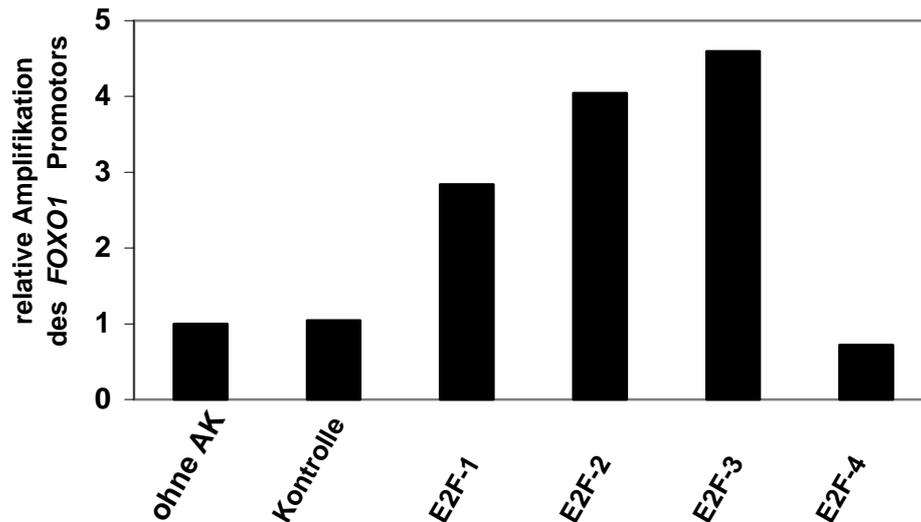


**Abb.14: E2F-1-ER bindet den *FOXO1* Promotor *in vivo*.** Das in den 1A3-Zellen durch 4-OHT aktivierte E2F-1-ER Fusionsprotein bindet an den *FOXO1* Promotor. Chromatin wurde von 4-OHT behandelten und unbehandelten Zellen isoliert und mit einem E2F-1 spezifischen Antikörper ( $\alpha$ -E2F-1) und einen Kontroll-Antikörper präzipitiert. 1  $\mu$ l des Präzipitates wurde als Template für die quantitative PCR eingesetzt und mit einem Primerpaar, das einen Bereich des *FOXO1* Promotors repräsentiert, amplifiziert. Die Auswertung der PCR erfolgte mit der komparativen  $\Delta$ Ct-Methode. Der Input wurde als endogene Referenz benutzt, die Proben ohne Antikörper als Kalibrator. In der Abbildung ist die Amplifikation des *FOXO1* Promotors in den Proben ohne Antikörper als 1 gesetzt.

In Gegenwart des aktivierten E2F-1-ER Fusionsproteins erfolgte eine 36-fach stärkere Amplifikation des *FOXO1* Promotors im Vergleich zu der Probe ohne Antikörper und dem Kontroll-Antikörper (Abb. 14). Dagegen zeigte die DNA, des mit dem  $\alpha$ -E2F-1 Antikörper gewonnenen Präzipitates, der unbehandelten Zellen lediglich eine 2,6fache Amplifikation des *FOXO1* Promotors im Vergleich zu der Probe ohne Antikörper und mit dem Kontroll-Antikörper. Demnach bindet das durch 4-OHT aktivierte E2F-1-ER Fusionsprotein an den Promotor des *FOXO1*-Gens. Somit ist in Neuroblastomzellen überexprimiertes E2F-1 in der Lage direkt den *FOXO1* Promotor zu binden.

#### 4.4.2 Endogenes E2F bindet den *FOXO1* Promotor *in vivo*

Nachdem *in vivo* die Bindung von überexprimierten E2F-1 an den *FOXO1* Promotor in 1A3-Zellen gezeigt wurde, sollte im folgenden Versuch die Bindung von den endogenen E2F Transkriptionsfaktoren (E2F-1 bis E2F-4) an den *FOXO1* Promotor untersucht werden. Dazu wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation mit IMR-32 Zellen, einer humanen Neuroblastomzelllinie, durchgeführt. Chromatin von IMR-32 Zellen wurde mit gegen E2F-1, E2F-2, E2F-3 und E2F-4 gerichteten spezifischen Antikörper, sowie mit einem Kontrollantikörper präzipitiert. (Die als Template für die PCR eingesetzten Präzipitate der IMR-32 Zellen wurden von PD Dr. Werner Lutz zur Verfügung gestellt).



**Abb.15: Endogenes E2F bindet den FOXO1 Promotor *in vivo*.** Aus IMR-32 Neuroblastom - zellen wurde Chromatin isoliert und mit spezifischen Antikörpern für die Transkriptionsfaktoren E2F-1 bis E2F-4 und einem Kontrollantikörper präzipitiert. Die zur quantitativen PCR verwendete Kontrolle enthielt keinen Antikörper. Mit den Präzipitaten aus IMR-32 Zellen wurde mit Hilfe der PCR eine Region des FOXO1 Promotors inkl. des Transkriptionsstarts amplifiziert. Die PCR wurde nach der nach der komparativen Ct-Methode ausgewertet. Zur Ermittlung der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte wurde der Input als endogene Referenz verwendet. Die Berechnung der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte erfolgte mit der Probe ohne Antikörper (Kalibrator). Auf dem Diagramm ist die Amplifikation des FOXO1 Promotors in Relation zu der Probe ohne Antikörper dargestellt.

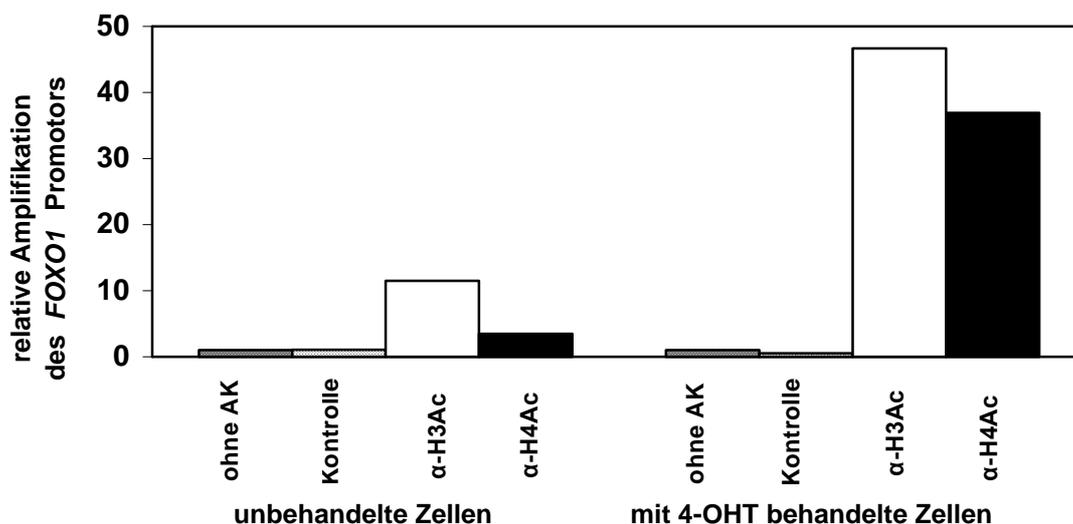
Die DNA-Fragmente, die mit dem für E2F-1, E2F-2 und E2F-3 spezifischen Antikörper präzipitiert wurden, zeigten eine drei- bis fünffache Anreicherung des FOXO1 Promotors im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 15). Die Stärke der Amplifikation der  $\alpha$ -E2F-4 Probe entspricht etwa der Probe ohne Antikörper. Demnach binden in den untersuchten IMR-32 Zellen spezifisch die „aktivierenden E2F-Transkriptionsfaktoren“ E2F-1, E2F-2 und E2F-3 an den FOXO1 Promotor.

#### 4.4.3 E2F-1 abhängige Acetylierung der Histone H3 und H4 am FOXO1 Promotor

Die Transkription von Genen wird reguliert durch Modifikationen am N-terminalen Schwanz der Histone (Roth et al., 2001). Eine Hyperacetylierung der Histone korreliert mit transkriptioneller Aktivität, während die Deacetylierung

der Histone zur Repression führt. Die Acetylierung und Deacetylierung werden von Histon-Acetyltransferasen (HATs) bzw. Histon Deacetylasen (HDACs) katalysiert, die von Transkriptionsfaktoren zu Ziel promotoren rekrutiert werden. Die „aktivierenden E2F's“ rekrutieren die Histonacetyltransferase Tip 60 (Taubert et al., 2004). Entsprechend weisen Promotoren, die E2F-1, E2F-2 und E2F-3 gebunden haben, in der späten G<sub>1</sub>- und S-Phase des Zellzyklus hyperacetylierte Histone auf (Takahashi et al, 2000). Auch die Aktivierung des E2F Zielgenes *BMI1* durch ein 4-OHT aktivierbares E2F-1-ER Fusionsprotein führt zur Acetylierung des Histons H4 am *BMI1* Promotor (Nowak et al. 2006). Mit dem folgenden Experiment sollte nachgewiesen werden, ob die E2F Bindung an den *FOXO1* Promotor zur Acetylierung der Histone H3 und H4 am *FOXO1* Promotor führt.

Dazu wurde in der Neuroblastomzelllinie 1A3 durch 16-stündige Zugabe von 4-OHT, das E2F-1-ER Fusionsprotein aktiviert, welches an den *FOXO1* Promotor bindet. Aus mit 4-OHT behandelten und unbehandelten 1A3-Zellen wurde Chromatin aus fixierten Zellen isoliert und mit einem spezifischen Antikörper gegen die acetylierten Histone H3 und H4 präzipitiert (Kramps et al., 2004). Die erhaltenen DNA-Präzipitate wurden wiederum als Template für die Durchführung einer quantitativen PCR mit einem Primerpaar eingesetzt, das den *FOXO1* Promotor amplifiziert (4.4.1, 4.4.2). Die für die PCR verwendeten Templates wurden von PD Dr. Werner Lutz zur Verfügung gestellt.



**Abb. 16: E2F-1-ER führt zur Acetylierung der Histone H3 und H4 am *FOXO1* Promotor.** In 1A3-Zellen wurde durch Gabe von 4-OHT das E2F-1-ER Fusionsprotein aktiviert. Aus unbehandelten Zellen und aus mit 4-OHT behandelten Zellen wurden Chromatinpräzipitate gewonnen. Die Präzipitation der DNA erfolgte mit einem für die acetylierten Histone H3 ( $\alpha$ -H3ac) und H4 ( $\alpha$ -H4ac) spezifischen Antikörper. Mit den Chromatinpräzipitaten wurde eine quantitative PCR durchgeführt, die mit Hilfe der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode ausgewertet wurde. Als Referenz wurde der Input verwendet; als Kalibrator die Probe ohne Antikörper. In dem Balkendiagramm wurde die relative Amplifikation der *FOXO1* Promotorsequenz der Chromatinpräzipitate mit  $\alpha$ -H3Ac und  $\alpha$ -H4Ac in Relation zu der Kontrolle ohne Antikörper dargestellt.

Die DNA, welche mit Antikörper gegen das acetylierte Histon H3 präzipitiert wurde, zeigte in Relation zur Kontrolle ohne Antikörper eine 46,6-fach stärkere Amplifikation (Abb. 16). Das Präzipitat, das mit dem Antikörper gegen das acetylierte Histon H4 gewonnen wurde, zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine 36,8fach stärkere Amplifikation. Bei den unbehandelten Zellen konnte keine starke Amplifikation des *FOXO1* Genes nachgewiesen werden. Lediglich die DNA der unbehandelten Zellen, die mit dem Antikörper für acetyliertes H3 präzipitiert wurde, zeigte eine 10fach höhere Amplifikation des *FOXO1* Promotors im Vergleich zur Kontrollprobe. In den untersuchten Neuroblastomzellen liegt somit bereits vor Aktivierung des E2F-1-ER Fusionsproteins eine Acetylierung des Histons H3 am *FOXO1* Promotor vor. Durch die Aktivierung des Fusionsproteins wird die Acetylierung von H3 jedoch weiter erhöht. Zugleich kommt es zu einer starken Acetylierung des Histons H4. Dies spricht für eine transkriptionelle Aktivierung des *FOXO1* Promotors und

eine Acetylierung von Histonen am FOXO Promotor durch überexprimiertes E2F-1 in Neuroblastomzellen.

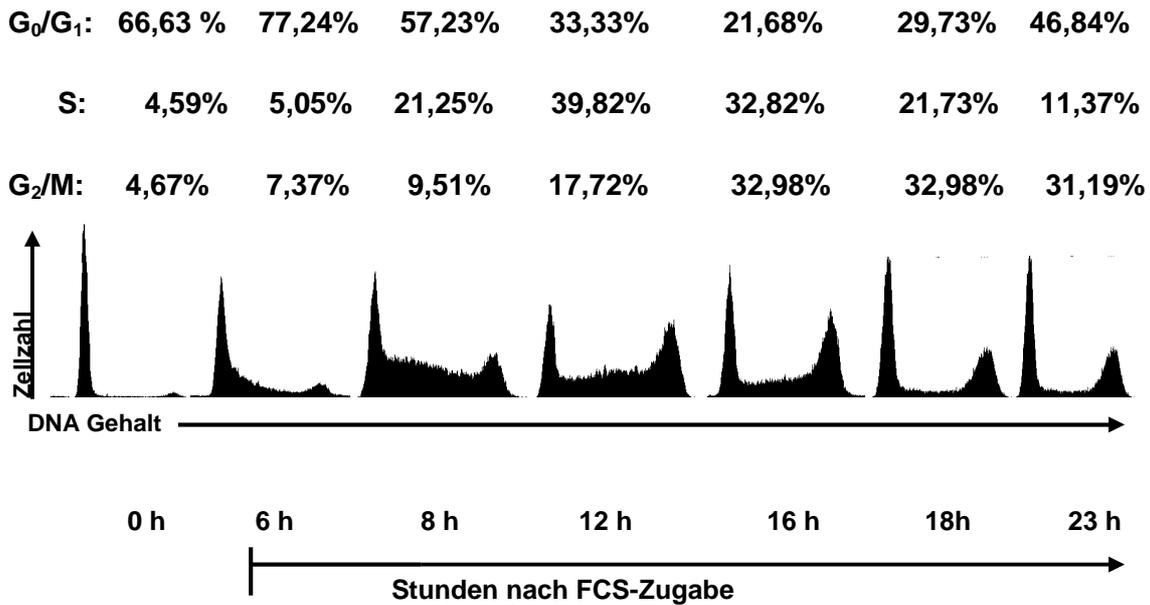
#### 4.5 FOXO1 wird unabhängig vom Zellzyklus reguliert

Die E2F Transkriptionsfaktoren spielen bei der Proliferation und für die Progression des Zellzyklus eine wichtige Rolle. Somit werden viele E2F-Zielgene in Abhängigkeit der Zellzyklusphasen reguliert. Klassische E2F-Zielgene, die innerhalb des Zellzyklus reguliert werden, sind z.B. bei der DNA-Replikation während der S-Phase involviert. In der späten G<sub>1</sub>-Phase werden sie in den Zellen exprimiert, um die DNA-Replikation und die sich anschließende Zellteilung zu initiieren (DeGregori et al., 1995; Ohtani et al., 1995; Vigo et al., 1999; Wu et al., 2001; Polager et al., 2002).

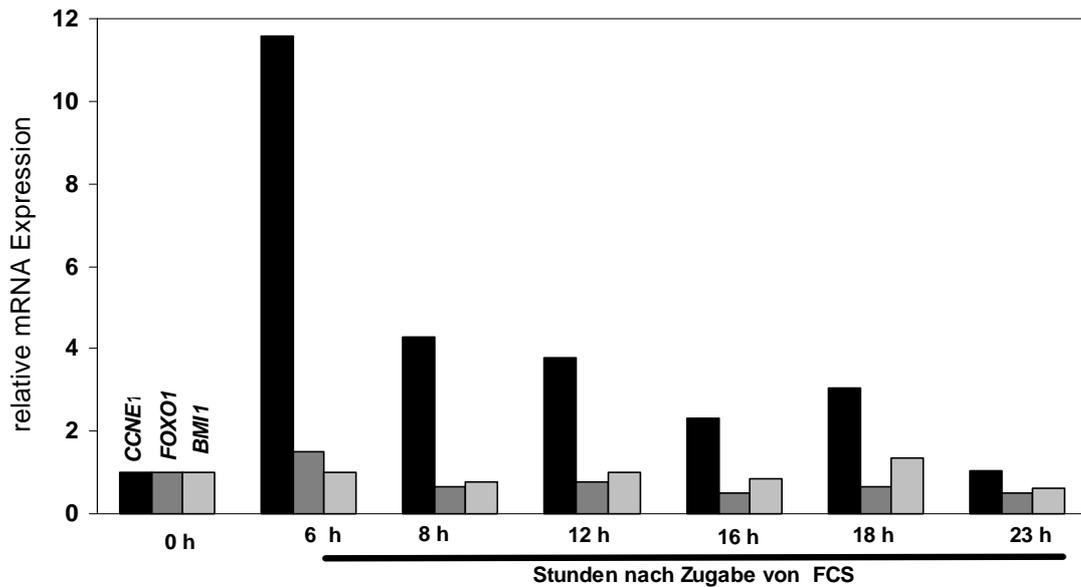
Mit dem folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob sich FOXO wie ein klassisches E2F-1 Zielgen verhält und ebenfalls in Abhängigkeit von bestimmten Stadien innerhalb des Zellzyklus exprimiert wird. Dazu wurden 1A3-Zellen für 48 h in serum-freiem Medium kultiviert. Durch den Entzug der Wachstumsfaktoren arretieren die Zellen im Zellzyklus. Anschließend wurden die quieszenten Zellen durch Gabe von FCS zum synchronen Wiedereintritt in den Zellzyklus angeregt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Stimulation mit Serum wurden die Zellen zur Durchführung einer FACS-Analyse fixiert. Zeitgleich mit der Probengewinnung für die FACS-Analyse wurde RNA aus den Zellen isoliert und zur cDNA-Synthese eingesetzt. Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Probenentnahme die Genexpression von FOXO1 analysiert. Als positive Kontrolle für ein E2F-reguliertes Zielgen, welches in Abhängigkeit von Zellzyklusstadien reguliert wird, wurde die Genexpression von CCNE1 (Cyklin E1) benutzt. Mit einem weiteren E2F-regulierten Gen, BMI1, das nicht in Abhängigkeit des Zellzyklus reguliert wird, wurde ebenfalls eine RT-PCR durchgeführt (Nowak et al, 2006).

Die FACS Analyse zeigte zum Zeitpunkt 0, direkt nach der 48-stündigen serumfreien Phase, dass sich 66,63% der 1A3 Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus befanden (Abb. 17A). 12 h nach Serum Zugabe hatten 39,45% der Zellen die S-Phase des Zellzyklus erreicht, in der die Replikation der DNA stattfindet. Nach 23 h befanden sich die Hälfte der Zellen erneut in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>Phase des Zellzyklus. 6 h nach der Serum-Zugabe nahm die Expression von

*CCNE1*, einem typischen zellzyklus-regulierten E2F-Zielgen um das 12fache im Vergleich zu den Zellen ohne FCS zu (Abb. 17B) . Mit der weiteren Progression des Zellzyklus fiel die Genexpression von *CCNE1* bei dem 23 h Wert wieder auf den Ausgangswert zurück. Die Genexpression von *FOXO1* und *BMI1* veränderte sich während der Zeitpunkte der Probenentnahmen nicht . *FOXO* wird demnach nicht wie „klassische Zielgene“ von E2F im Verlauf der Progression in die S-Phase induziert.



**Abb.17A: FOXO1 wird nicht in Abhängigkeit des Zellzyklus reguliert.** 1A3 -Zellen wurden für 48 h in serum-freiem Medium kultiviert und dann mit FCS (in einer finalen Konzentration von 15%) zum Wiedereintritt in den Zellzyklus stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Serum-Zugabe wurden die Zellen zur Durchführung der FACS-Analyse fixiert und mit Propidiumjodid gefärbt. In der Tabelle wird die prozentuale Verteilung der Zellen innerhalb der unterschiedlichen Zellzyklusphasen zu den Zeitpunkten der Probenentnahme angegeben. Darunter befinden sich die Zellzyklus-Profile in Form von Histogrammen der durchgeführten FACS Analyse. Unter den Histogrammen sind die Zeitpunkte der Probenentnahme für die FACS Analyse angegeben.



**Abb.17B: FOXO1 wird nicht in Abhängigkeit vom Zellzyklus reguliert.** 1A3 -Zellen wurden für 48 h in serum-freiem Medium kultiviert und dann durch 15%haltiges FCS-Medium zum Wiedereintritt in den Zellzyklus stimuliert. Zu definierten Zeitpunkten nach der Serum-Zugabe wurde die RNA der Zellen isoliert und für die cDNA-Synthese verwendet. Mit der cDNA wurde eine qRT-PCR in Duplikaten durchgeführt, die die Expression der E2F-Zielgene *BMI1* und *FOXO1* zeigt. *CCNE1* wurde als positive Kontrolle für ein E2F-Zielgen verwendet, welches in Abhängigkeit der Zellzyklusstadien reguliert wird.

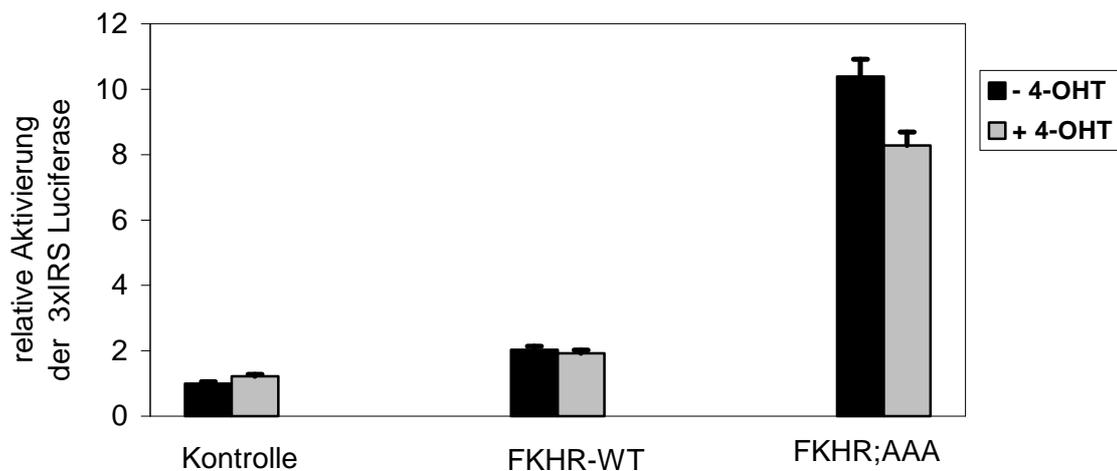
Das Balkendiagramm zeigt die Amplifikation von *FOXO1*, *BMI1* und *CCNE1* zu den verschiedenen Zeitpunkten der Probenentnahme in Relation zu der Probe zum Ausgangspunkt des Versuches bei 0 h. Die RT-PCR wurde mit der komparativen  $\Delta\text{Ct}$ - Methode ausgewertet. Als Referenz wurde die Ausgangsprobe bei 0 h benutzt, als Kalibrator wurde das humane *S14* Gen verwendet.

#### 4.6 E2F-1 beeinflusst nicht die Aktivierung von Zielgenen durch FoxO

Um einen möglichen Einfluss von E2F-1 auf die durch FoxO1 regulierte Transkription von Genen zu untersuchen, wurden transiente Reporteragen-Assays mit Luciferase Reportergenkonstrukten, die Bindungsstellen für FoxO Transkriptionsfaktoren besitzen, durchgeführt.

Als erstes Experiment, ob E2F-1 die FoxO1-regulierte Transkription beeinflussen kann, wurde ein synthetisches Luciferase Reportergenkonstrukt mit drei Tandemkopien des IRS Elementes (3x IRS) gewählt (Tang et al. 1999). An das IRS (insulin-responsive sequence) Element des *IGFBP1* Gens (Insulin-like -growth factor-binding 1Promotor) binden FoxO Transkriptionsfaktoren, die über ein IRS Element verfügen. (O'Brien et al., 1995; Unterman et al., 1994;

Tang et al., 1999). Als Expressionsplasmid wurde für diesen transienten Assay ein pcDNA3 Vektor ausgesucht, der die cDNA des humanen *FOXO1* Gens (pcDNA3-FKHR) enthält (Tang et al., 1999). Der Versuch wurde zusätzlich mit einer Mutante des humanen *FOXO1* Gens (FKHR;AAA) durchgeführt. Die Mutante des *FOXO1* Wildtyp Gens ist konstitutiv aktiv. Durch den Austausch von drei Aminosäuren ist diese FoxO1 Mutante nicht mehr für die Regulation durch Akt zugänglich. In PTEN negativen Zellen ist die Mutante im Kern lokalisiert und aktiviert konstitutiv FoxO1 regulierte Promotoren (Ramaswamy et al. 2002). Im folgenden Versuch wurden in U2OS-Zellen das 3xIRS Luciferase-Reportergenkonstrukt, die Expressionsplasmide FKHR, FKHR;AAA oder als Kontrolle der pcDNA3-Vektor transfiziert. Zusätzlich wurde ein E2F-1-ER Fusionsprotein in die Zellen kotransfiziert, welches durch Zugabe von 4-OHT aktiviert wurde. In Abb. 18 ist die Aktivierung des 3x IRS Promotors durch die FoxO Expressionsplasmide dargestellt.



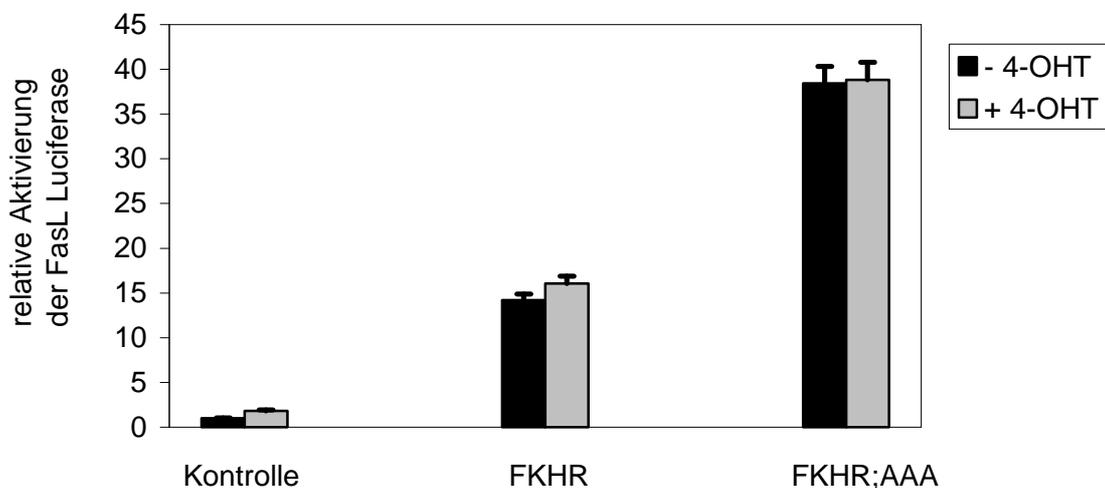
**Abb. 18: Einfluss von E2F-1 auf die Aktivierung des 3xIRS Promotors durch FoxO1**

U2OS - Zellen wurden mit einem 3xIRS-luc Reportergenplasmid, den Expressionsplasmiden FoxO1 Wildtyp (FKHR), der konstitutiv aktiven FoxO1 Mutante (FKHR;AAA) und einem E2F - 1 - ER Fusionsprotein transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen 1:1 gesplittet; nach weiteren 6 h erfolgte durch die Gabe von 4-OHT die Induktion des E2F-1-ER Fusionsproteins. 12 h nach 4-OHT Gabe wurde aus den unbehandelten Zellen und den mit 4 - OHT behandelten Zellen Lysate zur Messung der Luciferase-Aktivität hergestellt. Die gemessene enzymatische Aktivität der Luciferase wurde zum Proteingehalt der Zellen normalisiert. Im Balkendiagramm ist die normalisierte Luciferase-Aktivität in Relation zu den mit dem Leervektor pcDNA3 (Kontrolle) transfizierten Zellen dargestellt.

FoxO1 aktivierte den 3xIRS Promotor lediglich 2-fach. Die konstitutiv aktive FoxO1 Mutante zeigte eine 10-fache Erhöhung der Luciferase-Aktivität des 3xIRS Reportergenkonstruktes. Die Gegenwart des aktivierten E2F-1-ER Fusionsproteins verändert sich die Luciferase-Aktivität des 3xIRS-luc Reportergenkonstruktes kaum. Somit beeinflusst E2F-1 nicht die Aktivierung des 3xIRS Reporters durch FoxO-Proteine.

Mit einem weiteren transienten Assay sollte der Einfluss von E2F-1 auf die FoxO1 regulierte Aktivierung des FasL Promotors untersucht werden. Der humane Fas Ligand Promotor besitzt drei Bindungsstellen für die Forkhead Transkriptionsfaktoren. Diese Bindungsstellen werden in ihrer Gesamtheit als Forkhead responsive element (FHRE) bezeichnet (Holtz-Heppelmann et al., 1998; Brunet et al., 1999).

Dazu wurde ein Reportergenkonstrukt ausgewählt, das von ko-transfiziertem FoxO3 in einer Fibroblastenzelllinie 2-fach aktiviert wurde (Brunet et al., 1999). 1A3-Zellen wurden mit dem FasL Luciferase Reportergenkonstrukt, den Expressionsplasmiden für FoxO1 Wildtyp (FKHR), der konstitutiv aktiven FoxO1 Mutante (FKHR;AAA) oder dem Leervektor pcDNA3 transfiziert (Abb.19).



**Abb. 19: E2F-1 hat keinen Einfluss auf die FoxO1 abhängige Aktivierung des FasL Promotors in 1A3-Zellen.** In 1A3-Zellen wurde das FasL-luc Luciferase Reportergenkonstrukt und die Expressionsplasmide FoxO1 Wildtyp (FKHR), die konstitutiv aktive Mutante (FKHR;AAA) oder der pcDNA3 Leervektor transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen 1:2 auf zwei neue Schalen aufgeteilt. Die Hälfte der Zellen wurde zur Aktivierung des E2F-1-ER Fusionsprotein für weitere 12 h mit 4-OHT behandelt. Die Herstellung von Zelllysaten aus den transfizierten Zellen erfolgte 36 h nach der Transfektion.

Die Transfektionseffizienz von 20% wurde nach 24 h über die Expression des kotransfizierten eGFP geschätzt. Zur Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichung wurde die Transfektion in Triplikaten angesetzt.

Das Balkendiagramm zeigt die, über eine Proteinbestimmung nach Bradford, normalisierte relative Aktivierung des FasL Promotors von mit 4-OHT behandelten und unbehandelten Zellen in Relation zu dem pcDNA3 Leervektor (Kontrolle).

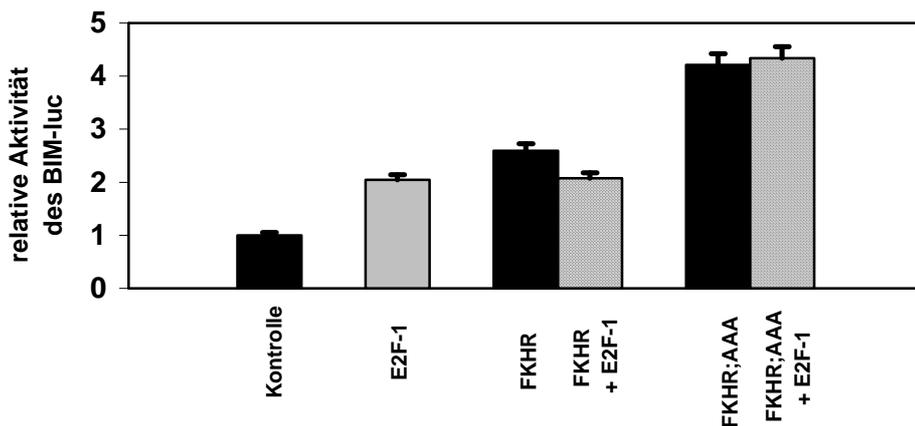
In den unbehandelten Zellen konnte FoxO1 den FasL Promotor ca. 14fach stärker aktivieren als den pcDNA3-Vektor, der als Kontrolle eingesetzt wurde (Abb. 19). Die konstitutiv aktive Mutante von FoxO1 führte bei den unbehandelten Zellen zu einer 38,4fachen Steigerung der Luciferase-Aktivität des FasL-luc Reporters in Relation zur Kontrolle. Die zusätzliche Aktivierung des E2F-1-ER Fusionsproteins beeinflusste die Aktivität des FasL Promotors nicht. Die relative Luciferase-Aktivität von mit 4-OHT behandelten und von unbehandelten Zellen war etwa gleich. E2F-1 hat somit keinen Einfluss auf die durch FoxO1 regulierte Transkription des FasL Promotors.

In den beiden durchgeführten transienten Assays mit dem 3xIRS und dem FasL Reportergenkonstrukt hatte E2F-1 keinen Einfluss auf die FoxO1 regulierte Transkription. Mit dem nächsten Experiment sollte untersucht werden, ob E2F-1 und FoxO an einen gemeinsamen Promotor binden können, der über Bindungsstellen für FoxO und E2F verfügt. Dafür wurde der *BIM* Promotor ausgesucht, da er über zwei konservierte Bindungsstellen für FoxO Transkriptionsfaktoren verfügt. Für FoxO3a konnte die direkte Bindung über diese Bindungsstellen nachgewiesen werden (Gilly et al., 2003); die durch FoxO3a induzierte *BIM* Expression führte zur Apoptose von sympathischen Neuronen (Gilley et al. 2003; Sunters et al 2003). *Bim* gehört als Bcl-2 homology 3 (BH3)only Protein zu der proapoptotischen Bcl-2 Familie. *BIM* ist als direktes Zielgen von E2F-1 bei der Induktion der E2F-1 abhängigen Apoptose involviert (Herschko und Ginsberg, 2003; Biswas et al., 2005). Die Überexpression von FoxO Transkriptionsfaktoren kann ebenfalls zu einer Induktion der *BIM* Expression führen und damit die *BIM* abhängige Apoptose einleiten.

Um eine mögliche Kooperation zwischen E2F-1 und FoxO1 bei der Aktivierung des *BIM* Promotors nachzuweisen, wurde ein transienter Assay mit einem *BIM* - luc Reporterkonstrukt durchgeführt (Bouillet et al. , 2001). Dazu wurden 1A3 -

Zellen mit Expressionsplasmiden für FoxO1 Wildtyp (FKHR), die konstitutiv aktive FoxO1 Mutante (FKHR;AAA) oder pcDNA3 als Kontrolle transfiziert. Zusätzlich wurde ein E2F-1 Expressionsplasmid (pCMV-E2F-1-HA) in die Zellen kotransfiziert.

E2F-1 und FoxO1 konnten einzeln den *BIM* Promotor jeweils 2,5-fach aktivieren (Abb. 20). Die gemeinsame Expression von E2F-1 und FoxO1 führte jedoch nicht zu einer zusätzlichen Erhöhung der Aktivität des *BIM* Promotors. Die konstitutiv aktive FoxO1 Mutante aktivierte den *BIM* Promotor vierfach. Die Anwesenheit von E2F-1 führte auch bei der konstitutiv aktiven Mutante zu keiner verstärkten Aktivierung des *BIM* Promotors. Eine Interaktion zwischen FoxO1 und E2F-1 konnte im dem durchgeführten transienten Assay unter den gewählten Bedingungen mit der Neuroblastomzelllinie 1A3 nicht nachgewiesen werden.



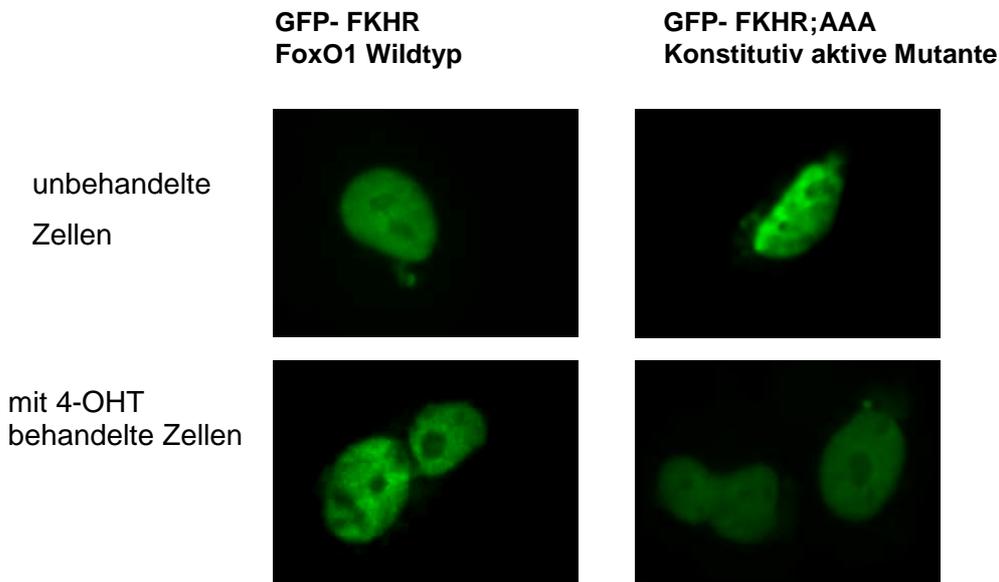
**Abb. 20: E2F-1 und FoxO1 zeigen keine Kooperation in der Aktivierung des *BIM*-luc**

**Reportergenes.** In 1A3-Zellen wurden das Luciferase Reporterkonstrukt *BIM*-luc und folgende Expressionsplasmide FoxO1 Wildtyp (FKHR), die konstitutiv aktive Mutante von FoxO1 und ein pCMV-E2F-1-HA transfiziert. Nach 36 h erfolgte die Herstellung von Zelllysaten zur Messung der enzymatischen Luciferase-Aktivität. Der Versuch wurde in Triplikaten angesetzt, um die Mittelwerte und die Standardabweichung berechnen zu können. Auf dem Balkendiagramm ist die, mit einer Proteinbestimmung nach Bradford, normalisierte relative Luciferase - Aktivität in Relation des Leervektors pcDNA-3 als Kontrolle abgebildet.

#### 4.7 In der Neuroblastomzelllinie 1A3 sind GFP-FoxO Fusionsproteine im Zellkern lokalisiert

Mit Hilfe der Chromatin-Immunopräzipitation konnte die Bindung von exogenen E2F-1-ER und endogenen E2F Transkriptionsfaktoren an den *FOXO1* Promotor nachgewiesen werden.

Mit dem folgenden Versuch sollte als Vorbereitung auf zukünftige funktionelle Studien zur Untersuchung der von E2F-1 induzierten FoxO-Proteine, die subzelluläre Lokalisation von FoxO1 in Neuroblastomzellen überprüft werden. Um die subzelluläre Lokalisation von FoxO1 zu untersuchen wurden Plasmide, die ein grün fluoreszierendes GFP-FoxO1(FKHR)-Fusionsprotein kodieren, transient in die Neuroblastomzelllinie 1A3 transfiziert (Nakamura et al., 2000). Neben dem GFP-FKHR Wildtyp Konstrukt wurde zusätzlich eine konstitutiv aktive FKHR Mutante (FKHR;AAA) in die Zellen transfiziert (Tang et al., 1999; Nakamura et al., 2000).



**Abb.21: Fluoreszenzmikroskopie des FoxO1-Wildtyps (FKHR) und der konstitutiv aktiven FoxO1 Mutante (FKHR;AAA).** In 1A3-Zellen wurden ein GFP -FoxO1 - Wildtyp Fusionsprotein und ein GFP-Fusionsprotein der konstitutiv aktiven FoxO1 Mutante (GFP-FKHR;AAA) transient exprimiert. 24 h nach der Transfektion wurde in 1A3 - Zellen durch 4-OHT für weitere 12 h das E2F-1-ER Fusionsprotein aktiviert. Nach weiteren 12 h wurden die Zellen bei Raumtemperatur mit Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden Präparate zur Mikroskopie angefertigt. Die Lokalisation der GFP-Fusionsproteine wurde mit einem Fluoreszenz-Mikroskop detektiert.

Die konstitutiv im Kern lokalisierte Mutante mit den drei veränderten Phosphorylierungsstellen, war auch in Neuroblastomzellen zu über 90% im Zellkern lokalisiert (Abb.21). Überraschenderweise lag in den Neuroblastomzellen auch das Wildtyp - Protein, dessen Kernlokalisierung durch die Akt-abhängige Phosphorylierung gehemmt wird, zum großen Teil im Zellkern vor. Dies deutet darauf hin, dass in diesen Zellen, selbst unter Standardkulturbedingungen mit 10% fötalem Kälberserum und entsprechend aktivem Akt, FoxO in den Kern gelangen kann. Die Lokalisation von FoxO im Zellkern in den untersuchten Neuroblastomzellen ist eine gute Voraussetzung für die Durchführung für funktionelle Assays. Mit Hilfe von funktionellen Assays könnte untersucht werden, unter welchen Bedingungen das im Kern lokalisierte FoxO transkriptionell aktiv ist und welche Folgen die Transkriptionsaktivität von FoxO für Neuroblastomzellen hat.

#### **4.8 Konditionelle systemische Rekombination eines geflochtenen Allels in der Maus**

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie effizient ein mutiertes Allel von p300 in der Maus durch ein Tamoxifen induzierbares CreER Fusionsprotein rekombiniert wird. Für die folgenden Experimente wurden doppelt heterozygote  $p300^{+/ASneo};RERTn$  Mäuse verwendet (Shikama et al. 2003; Roth et al. 2003). Die  $p300^{+/ASneo};RERTn$  Mäuse verfügen über das mutierte  $p300^{AS}$ -Allel mit einer dominant negativen Wirkung und exprimieren ubiquitär eine Tamoxifen induzierbare Cre-Rekombinase.

Der RERTn-Cre<sup>T2</sup> Mausstamm, der ubiquitär eine Tamoxifen induzierbare Cre-Rekombinase besitzt, wurde ausgewählt, da er im Gegensatz zu anderen Reporterlinien Vorteile hat. Die durch Tamoxifen induzierte Cre-Rekombinase ist nur in Gegenwart des Tamoxifens über vier Tage aktiv. Cytotoxische Effekte durch die unphysiologische Cre-Aktivität im Organismus werden durch die verwendete Cre-Rekombinase somit vermieden. Für das erste Austesten des Systems habe ich als Applikationsform die i.p. Injektionen von Tamoxifen in Pflanzenöl gewählt. Alternativ zu diesen Injektionen wäre auch die orale Applikation mit einer Sonde möglich. Jedoch ist bei den sehr jungen Tieren die Verletzungsgefahr von Lunge und Oesophagus sehr hoch, vor allem mit hoch-

viskösen Pflanzenöl als Lösungsmittel für das Tamoxifen. Die Injektionen wurden 4tägig durchgeführt, da unter einer einmaligen Applikation Mosaik in der Rekombination und eine geringere Rekombinationseffizienz von Hayashi und Mc Mahon beobachtet wurden (Hayashi und Mc Mahon, 2002).

In den folgenden Experimenten sollte überprüft werden, welche Rekombinationseffizienz des mutierten  $p300$ -Allels in verschiedenen Organen bei 4tägiger Gabe von 4 mg Tamoxifen i.p. einmal täglich erreicht werden kann. Doppelt heterozygote  $p300^{+/ASneo}$ ; RERTn Mäuse ab einem Alter von 8 Wochen wurden an vier aufeinander folgenden Tagen täglich mit 4 mg Tamoxifen i.p. injiziert. 10 Tage, 3 Monate und 6 Monate nach der Applikation des Tamoxifens wurden bei den, mit Tamoxifen behandelten, Tieren insgesamt 23 verschiedene Organe bzw. Gewebe zur RNA-Isolierung entnommen (Abb. 22). Das mutierte konditionelle  $p300^{ASneo}$ -Allel ist den heterozygoten  $p300^{+/ASneo}$ ; RERTn Mäuse zunächst inaktiv. Erst nach der Aktivierung der Cre-Rekombinase durch Tamoxifen kommt es zur Derepression des mutierten  $p300^{AS}$ - Allels. Um die Stärke der Rekombinationseffizienz in den Geweben bestimmen zu können, wurde eine quantitative allel-spezifische RT-PCR mit cDNAs der entnommenen Proben durchgeführt. Die mRNA Expression des dereprimierten  $p300^{AS}$ -Allels wurde in Abb. 23 relativ zum Wildtyp-Allel angegeben.

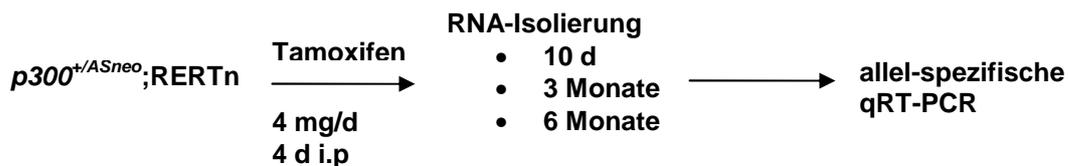


Abb. 22: Versuchsschema zur Überprüfung der Derepression von  $p300^{AS}$  in multiplen Geweben nach Induktion der Cre-Aktivität durch Tamoxifen.

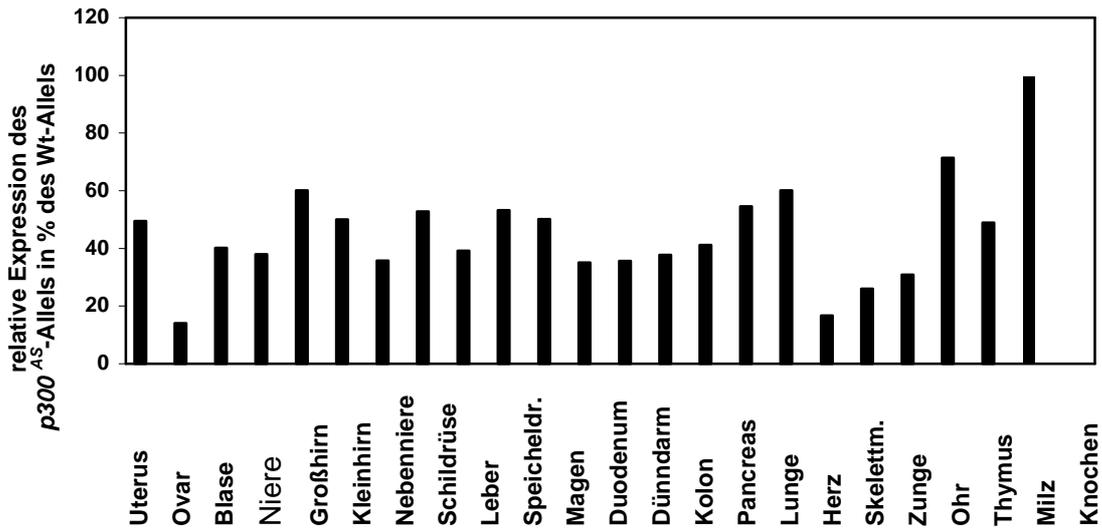


Abb. 23A: Liganden-induzierbare Rekombination von  $p300^{AS}$  in unterschiedlichen Organen/Geweben 10 d nach Tamoxifen Applikation.

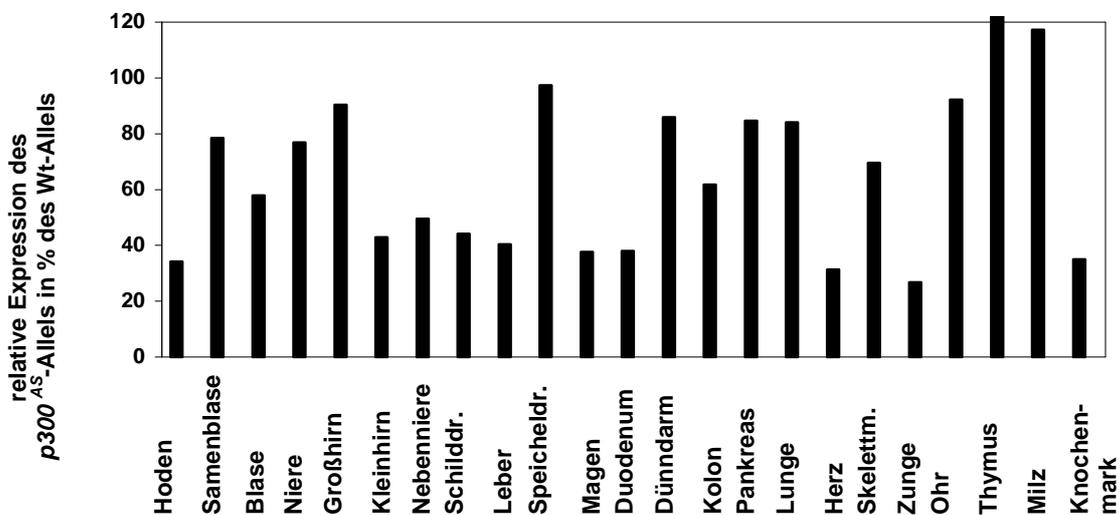
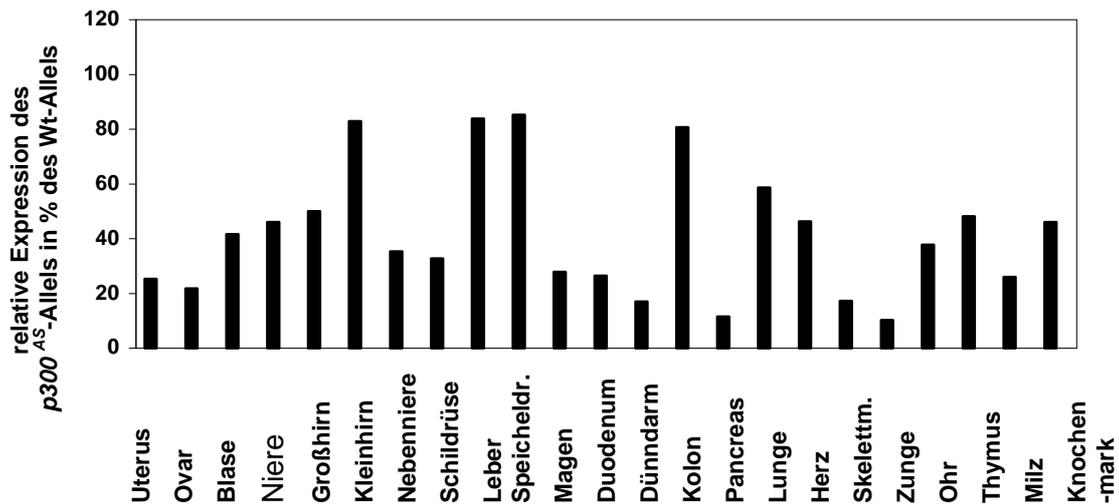


Abb. 23B: Liganden-induzierbare Rekombination von  $p300^{AS}$  in unterschiedlichen Organen/Geweben 3 Monate nach Tamoxifen Applikation.



**Abb. 23C: Liganden-induzierbare Rekombination von  $p300^{AS}$  in unterschiedlichen Organen/Geweben 6 Monate nach Tamoxifen Applikation.**

**Abb. 23 A, B, C:** Mit Hilfe einer allel-spezifischen RT-PCR wurde die Derepression des mutierten  $p300^{AS}$ -Allels in multiplen Geweben in doppelt heterozygoten  $p300^{ASneo};CreER^{T2}$  Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Tamoxifen-Behandlung nachgewiesen. Auf dem Diagramm ist die relative mRNA Expression des mutierten  $p300^{AS}$ -Allels als Ratio im Verhältnis zu dem  $p300$  Wildtyp-Allel dargestellt. Die qRT-PCR wurde nach der komparativen Ct-Methode ausgewertet.

Zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Tamoxifen Gabe konnte in allen entnommenen Geweben mit Hilfe der allel-spezifischen RT-PCR die Expression des mutierten  $p300^{AS}$ -Allels nachgewiesen werden. Der aktive Tamoxifen-Metabolit 4-OHT, der an das CreER<sup>T2</sup> Fusionsprotein binden kann und dadurch die Cre-Aktivität induziert, konnte bei den untersuchten  $p300^{ASneo};RERTn$  Mäusen die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Die Überwindung der Blut-Hirnschranke ist konsistent mit früheren, publizierten Daten (Feil et al., 1996; Hayashi und McMahon, 2002). Im Großhirn und Kleinhirn konnte eine durchschnittliche Rekombinationsrate von 60% erreicht werden. Die durchschnittliche Rekombinationrate der unterschiedlichen Organe lag zwischen 40-60%, wobei die Expression des geflochten mutierten  $p300$ -Allels in den Tieren zu den unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten stark variierte. Ähnliche Rekombinationseffizienzen um die 40% konnten in der Niere, Blase, Nebenniere und im Duodenum bei allen drei Tieren beobachtet werden. Große Unterschiede in der Rekombinationseffizienz ergaben sich vor allem in den blutbildenden Organen wie Milz (embryonale Blutbildung) und im Knochenmark. Bei der Organentnahme nach 6 Monaten war die geringste Rekombinations-

effizienz der Milz mit 25% und des Knochenmarks mit 40% zu verzeichnen. Dagegen zeigte die Organentnahme nach drei Monaten eine 100%ige Rekombinationseffizienz des mutierten p300-Allels in der Milz. Die Rekombinationseffizienz des mutierten p300-Allels nach 10 d betrug 50%, die des entnommenen Knochenmarks um die 90%. Die Rekombinationseffizienz des mutierten p300-Allels im Verdauungstrakt: Zunge, Magen Duodenum, Dünndarm und Kolon lag 10 Tage nach der Tamoxifen-Injektion bei ca. 40-50%. Drei Monate nach der Tamoxifen-Injektion lag die Rekombinationseffizienz des mutierten p300-Allels der Zunge bei 30%, bei Magen und Duodenum bei 40%, während die Rekombinationseffizienz des Dünndarms 90% betrug und die des Kolons bei 75% lag. Sechs Monate nach der Induktion der Cre-Rekombinase konnte bei der Zunge eine Rekombinationseffizienz von 10%, bei Magen und Duodenum eine Rekombinationseffizienz von 27%, beim Dünndarm eine Rekombinationseffizienz von 17% und beim Kolon eine Rekombinationseffizienz von 80% nachgewiesen werden. Im Uterus betrug die Rekombinationseffizienz nach 10 Tagen 50% und im Ovar 14%. Sechs Monate nach Induktion der Cre-Rekombinase betrug die Rekombinationseffizienz des Uterus 25% und des Ovars 22%. Bei dem männlichen Tier konnte drei Monate nach Tamoxifen-Gabe eine Rekombinationseffizienz im Hoden von 34% und in der Samenblase von 78% nachgewiesen werden. Eine qRT-PCR mit der cDNA aus Geweben einer p300+/+ Maus, wurde als Kontrolle durchgeführt. Bei diesem Tier konnte in keinem Gewebe Expression des p300<sup>AS</sup>-Allels detektiert werden (nicht gezeigte Daten).

Neben der Rekombinationsfähigkeit des mutierten p300-Allels der entnommenen Organe sollte auch überprüft werden, ob in einzelnen Geweben Zellen, die das mutierte p300-Allel exprimieren einen Wachstumsvorteil oder Wachstumsnachteil hatten. Durch die Streuung der Rekombinationseffizienz innerhalb der untersuchten Tiere lässt sich keine eindeutige Aussage treffen, ob einzelne Zelltypen, in denen das mutierte p300-Allel exprimiert wurde Wachstumsvor – oder nachteile hatten. Unterschiede in der Rekombinationseffizienz zwischen dem männlichen und den weiblichen Tieren ergeben sich zudem durch eine unterschiedliche Verteilung und Dichte der Östrogenrezeptoren und die Möglichkeit des extrahepatischen Östrogen-Metabolismus (z.B. im Uterus). Somit ist die Rekombinationseffizienz zwischen

männlichen und weiblichen Tieren nur beschränkt vergleichbar.

## 5 Diskussion

### 5.1.1 FOXO1 ist ein direktes Zielgen von E2F-1

Ziel der vorliegenden Arbeit war es *FOXO1* als ein Zielgen von E2F-1 in Neuroblastomzellen zu verifizieren. Zunächst konnte die E2F-1 abhängige Induktion der Genexpression von *FOXO1* mit Hilfe der RT-PCR nachgewiesen werden. Auch die Proteinmenge von FoxO3A nahm in Gegenwart des aktivierten E2F-1-ER Fusionsproteins zu. Diese ersten Ergebnisse haben gezeigt, dass exogenes E2F-1 die Genexpression von *FOXO1* und *FOXO3A* induzieren kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch in Abwesenheit von Proteinbiosynthese die Genexpression von *FOXO1* durch E2F-1 induziert werden konnte. Die Induktion von *FOXO1* durch E2F-1 ist also ohne Zwischenschritte bzw. Mediatoren, die über eine Proteinbiosynthese hergestellt werden müssen, möglich. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass *FOXO* ein direktes Zielgen von E2F ist. Dafür spricht auch der Umstand, dass in transienten Assays der Promotor des *FOXO1* durch überexprimiertes E2F-1, E2F-2 und E2F-3 aktiviert wurde.

Der Verlust der Funktionsfähigkeit einer der drei potentiellen Bindungsstellen für E2F innerhalb des *FOXO1* Promotors führte nicht zu einer reduzierten Aktivität des mutierten *FOXO1* Promotors. Die Zerstörung einer potentiellen Bindungsstelle für E2F im *FOXO1* Gen war somit nicht ausreichend, um eine Aktivierung des *FOXO1* Promotors zu unterbinden. Ähnliche Beobachtungen gibt es für eine Reihe von anderen Genen, die ebenfalls multiple E2F Bindungsstellen enthalten (Ohtani et al., 1995; Seelan et al., 2002).

Mit Hilfe der ChIP konnte die Bindung von exogenen E2F-1 und endogenen E2F an den *FOXO1* Promotor in Neuroblastomzellen nachgewiesen werden. Diese *in vivo* Resultate stimmen mit dem Ergebnis des transienten Assays überein, bei dem die drei „aktivierenden“ E2F Transkriptionsfaktoren ebenfalls zur Aktivierung des humanen *FOXO1* Promotors führten. Voraussetzung für die transkriptionelle Aktivierung eines Gens sind kovalente Veränderungen der Chromatinstruktur durch Acetylierung der Histone. Die Hyperacetylierung der Histone korreliert mit einer transkriptionellen Aktivierung, während die Deacetylierung zur Repression des Gens führt. Es ist bekannt, dass die aktivierenden Transkriptionsfaktoren E2F-1, E2F-2 und E2F-3 an ihre Zielpro-

motoren binden, und Histonacetylasen als Ko-Regulatoren wie z.B. Tip-60 rekrutieren (Taubert et al., 2004). Die E2F-regulierte Transkription führt über die Aktivierung der Histonacetylasen zu einer Acetylierung der Histone H3 und H4 im Bereich des *FOXO1* Promotors (Takahashi et al., 2000). Für den *FOXO1* Promotor konnte mit Hilfe der Chromatin-Immunopräzipitation ebenfalls die Acetylierung der Histone H3 und H4 am durch E2F-1 regulierten *FOXO1* Promotor nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass E2F-1 direkt an den *FOXO1* Promotor bindet und die transkriptionelle Aktivität von *FOXO1* durch E2F-1 reguliert wird.

#### 5.1.2 *FOXO1* ist ein Zielgen von E2F-1, welches unabhängig vom Zellzyklus reguliert wird

In einer durchgeführten ChIP-chip Analyse wurden etwa 8750 Gene als E2F-1 regulierte Gene eingestuft (Bieda et al., 2006). In den letzten 20 Jahren wurden viele E2F Zielgene identifiziert, die eine Rolle in der Zellzyklus-Progression spielen und damit in Abhängigkeit von den Zellzyklusstadien reguliert werden. Diese Gene werden als klassische E2F Zielgene bezeichnet und vor allem während der DNA-Replikation in der S-Phase, bei der Mitose und der Zellteilung exprimiert (Ishida et al., 2001; Cam und Dynlacht, 2003; Dimova et al., 2003). Allerdings wurden in den vergangenen Jahren auch E2F Zielgene beschrieben, die wie *FOXO1*, nicht in Abhängigkeit des Zellzyklus reguliert werden (Iwanaga et al., 2007). Zumindest einige dieser Gene spielen eine Rolle bei der Differenzierung von Zellen und in der Embryonalentwicklung (Suzuki und Hemmati-Brivanlou, 2000; Fajas et al., 2002; Dimova et al., 2003). In *C.elegans* ist E2F verantwortlich für die Anlage und Vermehrung von Zellen in der frühen Embryonalentwicklung (Page et al., 2001). In *Drosophila melanogaster* wird die dorsoventrale Polarität der Oocyten durch E2F reguliert (Myster et al., 2000; Cayirlioglu et al., 2001). Die physiologische Funktion der verschiedenen E2F Transkriptionsfaktoren für die Zellteilung, Differenzierung und Embryonalentwicklung ist immer abhängig vom zellulären Kontext und den jeweiligen Zelltypen (Dimova und Dyson, 2005). *ARF* ist wie *FOXO* ein Zielgen von E2F, welches unabhängig vom Zellzyklus reguliert wird (Lowe und Sherr, 2003; Ginsberg, 2004). Die Aktivierung von *ARF* durch E2F konnte unter

unter pathologischen Zuständen für die Zelle, z.B. bei onkogenischem Stress, abnormen Wachstumssignalen, beobachtet werden (Mason et al., 2002; Komori et al., 2005). Dagegen ist E2F-3 unter normalen Bedingungen in der Zelle ein Repressor für *ARF* (Aslanian et al., 2004). Die *FOXO* Gene könnten sich ähnlich wie *ARF* verhalten und nur bei Vorliegen einer Dysregulation von E2F ihre Funktion ausüben. Die zellzyklus-unabhängige Induktion von *FOXO* durch E2F könnte auch unter bestimmten zellulären Bedingungen wie z.B. die Gegenwart von oxidativem Stress oder unter zytotoxischen Einflüssen für die Zelle von Bedeutung sein.

### 5.1.3 E2F-1 beeinflusst nicht die Aktivierung von Zielgenen von FoxO1 im transienten Assay

Mit Hilfe von transienten Assays sollte untersucht werden, ob die Gegenwart von E2F-1 die Aktivierung FoxO abhängigen Reportergenkonstrukten beeinflusst. In den durchgeführten transienten Assays konnte kein Einfluss von E2F-1 auf die durch FoxO aktivierten Reporter gene (3xIRS; FasL) unter den gewählten Versuchsbedingungen nachgewiesen werden. Auch der *BIM* Promotor, der über Bindungsstellen für FoxO und E2F Transkriptionsfaktoren verfügt, zeigte keine verstärkte Aktivierung in der Gegenwart von FoxO und E2F.

Dagegen zeigt der Transkriptionsfaktor RUNX3 eine Interaktion mit FoxO3a über die Aktivierung des *BIM* Promotors und die daraus resultierende Apoptose in Magenkarzinomzellen (Yamamura et al., 2005). Diese Kooperation von RUNX3 und FoxO3a zur Induktion von Apoptose scheint bei der Tumorsuppression bei Magenkarzinomen von Bedeutung zu sein.

Hier stellt sich die Frage, ob die über E2F-1 induzierte *BIM* Expression als Zwischenschritt die Genexpression von *FOXO* benötigt, um in die gemeinsame Endstrecke der *BIM*-induzierte Apoptose zu münden (Abb. 23). Ob in Neuroblastomzellen eine Kooperation von E2F-1 und FoxO zur Induktion der Apoptose notwendig ist, müsste weiter untersucht werden.

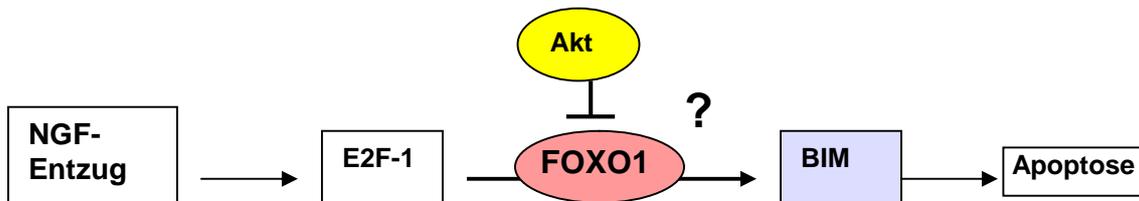


Abb. 23: Hypothese zur E2F-1 induzierten Apoptose über Expression von *FOXO1*.

#### 5.1.4 Bedeutung der Ergebnisse für die Rolle des Transkriptionsfaktors FoxO im Neuroblastom

Durch exogenes E2F-1 konnte in Neuroblastomzellen sowohl die Expression von *FOXO1* als auch von *FOXO3A* induziert werden. FoxO1 und FoxO3A sind in vieler Hinsicht funktionell redundant. Somit erhöht E2F die Gesamtaktivität von FoxO in Neuroblastomzellen ganz erheblich. Deshalb kann man von einer physiologischen Relevanz dieser Regulation für Neuroblastomzellen ausgehen. FoxO Transkriptionsfaktoren stehen unter dem Einfluss von E2F-1 und dem PI3K/Akt Signalweg. E2F-1 sowie der PI3K/Akt Signalweg sind in Tumoren dysreguliert (Vianco und Sawerys, 2006). Eine abnormale Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges ist assoziiert mit einer schlechten Prognose für Neuroblastom Patienten und korreliert häufig mit einer *MYCN* Amplifikation (Opel et al., 2007).

So kann man davon ausgehen, dass eine abnorme FoxO-Aktivität für die Entstehung von Tumoren eine Rolle spielt und die *FOXO* Gene Tumorsuppressorgene repräsentieren (Arden, C., 2006). In Neuroblastomzellen konnte durch exogenes unphosphoryliertes FoxO3 Apoptose induziert werden (Obexer et al., 2006). Dies spricht dafür, dass der PI3K-FoxO Signalweg in Neuroblastomen vorhanden ist und aktiviert werden kann. Die durch FoxO induzierte Apoptose wurde in differenzierten Neuronen nachgewiesen (Zheng et al., 2002; Gilley et al., 2003; Zhu et al., 2004).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde ein Zellklon (1A3) der Neuroblastomzelllinie SK-N-SH-EP verwendet. In dieser Neuroblastomzelllinie konnte kein Pten Verlust nachgewiesen werden (Muñoz et al., 2004). In untersuchten primären Neuroblastom konnte nur in etwa 5% der Tumorproben ein homozygoter Pten Verlust festgestellt werden. Dies bedeutet, dass Pten als Antagonist des PI3K/Akt Signalwege in Neuroblastomzellen

vorhanden ist. Die posttranslationelle Regulation der FoxO Transkriptionsfaktoren durch den PI3K/Akt Signalweg ist wahrscheinlich in Neuroblastomzellen erhalten oder kann unter bestimmten Bedingungen reaktiviert werden. Konsistent mit dieser Annahme lag ein transient exprimiertes GFP-FoxO-Fusionsprotein hauptsächlich im Zellkern vor. Somit kann man davon ausgehen, dass FoxO in Neuroblastomzellen transkriptionell aktiv sein und eine physiologische Funktion in den Zellen ausüben kann.

Um die physiologische Rolle der FoxO Transkriptionsfaktoren in Neuroblastomzellen weiter analysieren zu können, würden Experimente mit FoxO-defizienten Neuroblastomzellen weiter helfen. Mit Hilfe von siRNAs könnte der Transkriptionsfaktor FoxO in Neuroblastomzellen transient ausgeschaltet werden. Eine andere Möglichkeit, FoxO in der Zelle in seiner Funktionsfähigkeit einzuschränken, wäre das Einbringen eines dominant negativen FoxO Transkriptionsfaktor in Neuroblastomzellen (Bouchard et al., 2004).

Um die Beteiligung von FoxO1 in der E2F-1 induzierten Apoptose untersuchen zu können, eignen sich ebenfalls Experimente mit der Neuroblastomzelllinie 1A3. In den 1A3-Zellen kann über die Gabe von 4-OHT das E2F-1-ER Fusionsprotein aktiviert werden. Zeitgleich könnte durch siRNAs oder die Gegenwart eines dominant negativen FoxO Proteins FoxO als Transkriptionsfaktor in der Zelle ausgeschaltet werden. Auf diese Weise könnte man feststellen, ob bei E2F-1 induzierten Apoptose die Genexpression von *FOXO1* involviert ist. Zudem könnte man untersuchen, unter welchen Bedingungen (z.B. in der Gegenwart von oxidativem Stress oder zytotoxischen Einflüssen) die E2F-regulierte Expression von *FOXO* für Neuroblastomzellen eine Rolle spielt.

In Neuroblastomen korreliert die Überexpression von *MAD2*, die häufig mit einer Überexpression oder Amplifikation von *MYCN* assoziiert ist, beides sind Zielgene von E2F, die mit einer schlechten Prognose für die Patienten einhergehen (Hernando et al., 2004). *BMI1* ist ebenfalls ein Zielgen von E2F-1 und wird als molekularbiologischer Marker bei CML Patienten eingesetzt. Eine erhöhte *BMI1* Expression ist assoziiert mit einem aggressiven progressiven Krankheitsverlauf bei CML Patienten (Mohty et al., 2007). Mit Hilfe dieser E2F-Zielgene kann die Therapie von Tumorpatienten dem aggressiven Krankheits -

verlauf entsprechend angepasst werden, um damit durch Chemo- und Radiotherapie entstehende sekundäre maligne Neoplasien zu vermeiden. (Henry et al., 2005). Da einige E2F-Zielgene bereits in der Routine als prognostische Marker für aggressive Krankheitsverläufe genutzt werden, wäre es interessant zu untersuchen, ob die *FOXO* Gene – als E2F - Zielgene – sich ebenfalls als prognostische Marker eignen. Dazu müsste die Expression von *FOXO* in primären Neuroblastomen untersucht werden und in Korrelation mit klinischen Parametern z.B. dem Tumorstadium, Alter usw. gesetzt werden.

### 5.2.1 Induzierbare systemische Rekombination eines geflochten Allels in der Maus

Die i.p. Injektion von Tamoxifen (4 mg /4 d) in doppelt heterozygoten  $p300^{+/AS}; CreER^{T2}$  Mäusen resultierte in der Rekombination des geflochten  $p300^{AS}$ -Allels in einem breiten Spektrum von unterschiedlichen Organen und Geweben. Das konditionelle Knock-in System bei dem ubiquitär ein CreER<sup>T2</sup> Fusionsprotein exprimiert wird und die Cre-Aktivität im gesamten Organismus durch metabolisiertes Tamoxifen (4-OHT) induziert wird, scheint in dem untersuchten konditionellen Mausmodell funktionsfähig zu sein.

Der Tamoxifen-Metabolit 4-OHT konnte in den mit Tamoxifen injizierten  $p300^{ASneo}; CreER^{T2}$  Mäusen die Bluthirnschranke penetrieren. In Groß- und Kleinhirn konnte die Derepression des mutierten  $p300^{AS}$ -Allels nachgewiesen werden. Andere Arbeitsgruppen konnten ebenfalls eine Cre-Rekombinase Aktivität in unterschiedlichen Gehirnbereichen nachweisen (Feil et al., 1996; Hayashi und McMahon, 2002; Schmidt-Suppryan und Rajewsky, 2007). Die durchschnittliche Rekombinationseffizienz des mutierten p300-Allels lag in den untersuchten Geweben zwischen 40-60%.

Eine 100%ige Rekombination wurde lediglich im Knochenmark 10 d nach der Tamoxifen-Gabe, sowie in Thymus und Milz 3 Monate nach der Tamoxifen-Injektion erreicht. Die Rekombinationseffizienz könnte gegebenenfalls durch repetitive Tamoxifen Injektionen oder durch die Applikation von Tamoxifen über einen längeren Zeitraum (2-3 Wochen) erhöht werden (Agger et al., 2005). Ebenso könnte man direkt den aktiven Tamoxifen Metaboliten, 4-OHT, den Tieren i.p. injizieren. Trans-4-OHT hat im Vergleich zu trans-Tamoxifen eine 100fach höhere Affinität zu Östrogen-Rezeptoren (Williams et al., 1994). Wobei

berücksichtigt werden muss, dass 4-OHT eine kurze Halbwertszeit hat und in der Leber in Phase I Reaktionen sofort zu unwirksamen Metaboliten abgebaut wird (Robinson et al., 1991). Die Metabolisierung des 4-OHT findet zum Teil auch extrahepatisch im Endometrium des Uterus statt, so dass man in den unterschiedlichen Organen nie gleiche 4-OHT Konzentrationen erreichen wird. Ebenfalls ist auch 4-OHT zu 98% im Blut an Plasmaproteine gebunden. In dem 6monatigem Zeitraum nach der Induktion der Cre-Rekombinase hat im Vergleich zu den anderen beiden Tieren keine wesentliche Selektion gegen das mutierte p300 statt gefunden.

### 5.2.2 Faktoren, die die Effizienz der Tamoxifen induzierbaren Cre-Rekombinase beeinflussen

Die allel-spezifische qRT-PCR zeigte, dass die Stärke der Derepression des mutierten  $p300^{AS}$ -Allels in den Mäusen zu den unterschiedlichen Entnahmezeiten sehr variierte. Die entnommenen Organe bestehen aus verschiedenen Zelltypen. Innerhalb der einzelnen Zelltypen variiert die Expression der CreER<sup>T2</sup> und die lokale Konzentration von 4-OHT ist in den Organen unterschiedlich z.B im Gehirn geringer (Robinson et al., 1991; Feil et al., 1996; Vooijs et al., 2001; Jullien et al., 2008). Somit ergeben sich Unterschiede in der Rekombinationseffizienz in den unterschiedlichen Organsystemen des Organismus. Grundsätzlich ist die Rekombinationseffizienz abhängig von dem Abstand der beiden loxP-Sequenzen zueinander zu dem Zielgen (Vooijs et al., 2001). Zudem variiert die transkriptionelle Aktivität des gewünschten Zielgens in den unterschiedlichen Geweben.

Die systemische Rekombination des geflochten Allels könnte bereits mit einer einmaligen Tamoxifen i.p. Injektion induziert werden. Allerdings wurde bei der Applikation einer hohen Einzeldosis die Entstehung von Mosaiken in der Rekombination und zudem eine geringere erfolgreiche Rekombination in den Geweben beobachtet (Hayashi und McMahon, 2002). Deshalb wurde zum ersten Austesten des konditionellen Mausmodells den Mäusen über vier Tage lang täglich einmal Tamoxifen i.p. appliziert.

Die meisten Arbeitsgruppen benutzen zur Induktion der Cre-Rekombinase Tamoxifen und nicht den bereits aktiven Metaboliten 4 - OHT, da Tamoxifen

besser löslich und weniger kostet (Branda und Dymecki, 2004). Somit ist eine weitere Voraussetzung für eine effiziente systemische Rekombination die Metabolisierung des Tamoxifens zu 4-OHT in der Phase I-Reaktion der Leber gegeben. Bei diesem Prozess wirken verschiedene Isoenzyme vom Cytochrom P450 mit. Die Isoenzyme von P450: Cyp2D6, Cyp2C9 und Cyp3A4 haben die Fähigkeit in den Leber-Mikrosomen Tamoxifen zu 4-OHT zu konvertieren (Crewe et al., 1997; Dehal u. Kupfer, 1997). Zudem existieren jeweils zwei geometrische Isoformen vom Tamoxifen und 4-OHT (Williams et al., 1994). Die Interkonversion der trans- und cis-Formen von 4-OHT wird ebenfalls in den Mikrosomen der Leber katalysiert. Diese Isomerisierung innerhalb des Organismus findet interindividuell statt und kann evtl. Auswirkungen auf die Menge des im Organismus verfügbaren 4-OHT haben. Ebenfalls könnte eine der Isoformen bevorzugt und mit größerer Effizienz am CreER<sup>T2</sup> Fusionsprotein binden. Bei der Behandlung von Patientinnen mit Brustkrebs korreliert der Gehalt an cis-4-OHT mit der Tamoxifen-Resistenz in der Therapie (Crewe et al., 2002). Ob die cis-/trans-Isomerisierung des 4-OHT die Rekombinationseffizienz in CreER induzierbaren Mausmodellen beeinflusst, ist bislang noch nicht untersucht worden. Die interindividuellen Variationen in der Fähigkeit Tamoxifen zu metabolisieren, beeinflussen die gewebe-spezifische Rekombination und damit auch die Derepression des mutierten *p300<sup>AS</sup>*-Allels. Beim Vergleich von Leber-Mikrosomen von Menschen, Ratten und Mäusen zeigten Mäuse eine höhere Metabolisierungsrate von Tamoxifen zu 4-OHT und eine höhere Detoxifikation der Tamoxifen-Metaboliten, was in einem sehr schnellen Abbau von Tamoxifen resultiert (Lim et al., 1994). Um über vier Tage einen kontinuierlichen Spiegel von 4-OHT im Organismus aufrecht zu erhalten, könnte evtl. die Tagesdosis halbiert und zweimal am Tag appliziert werden.

Die Effizienz der Rekombination ist von der applizierten Tamoxifen-Dosis abhängig (Hayashi und McMahon, 2002). Je mehr Tamoxifen den Tieren gegeben wurde, umso effizienter war die Rekombination. Allerdings muss bei der Applikation von Tamoxifen der LD<sub>50</sub>-Wert berücksichtigt werden. 8 mg Tamoxifen i.p. injiziert zeigten in der Arbeit von Guo bereits toxische Effekte, wobei die Gabe des Metaboliten 4-OHT bereits in geringerer Dosis toxisch für die Mäuse war (Guo et al., 2002). In der Brustkrebs-Therapie bei Frauen werden täglich 10 -30 mg Tamoxifen eingesetzt. Zur Induktion der Cre -

Rekombinase in den konditionellen Mausmodellen wird in Mäusen die 500fache Dosis in Relation zu dem Körpergewicht appliziert (Kiermayer et al., 2007). Welche Auswirkung diese extrem hohen Tamoxifen-Dosen für den Organismus und die Tamoxifen-Metabolisierung in der Leber haben, ist bislang unbekannt. Eine erst vor kurzem beschriebene Alternative zu der i.p. Injektion des Tamoxifens der Mäuse wäre eine 3-4wöchige tägliche Fütterung mit einer geringen Tamoxifen-Citrat Dosis. Nach einer 4wöchigen Tamoxifen-Citrat Gabe konnte im Vergleich zur i.p. Injektion eine vergleichbare Rekombinationseffizienz festgestellt werden (Kiermayer et al., 2007). Die Fütterung von Tamoxifen-Citrat würde den akuten Injektionsschmerz und den Distress der Tiere während der Injektion verhindern. Gerade bei konditionellen Mausmodellen, in denen z.B. das Lernverhalten untersucht werden soll, wäre die Tamoxifen-Fütterung eine Alternative zur Injektion, da Distress und Schmerzen unweigerlich zu Veränderungen im Verhalten führen.

### 5.2.3 Geno-und zytotoxische Effekte von Cre-Rekombinasen

Das Cre/loxP-System ist ein wichtiges Werkzeug geworden, um genetische Manipulationen an transgenen Mäusen vornehmen zu können. Ein Problem für die Cre-Rekombinase abhängigen konditionellen Maus-Modelle könnten die genotoxischen und zytotoxischen Effekte der Cre-Rekombinase sein (Schmidt-Supprian und Rajewsky, 2007). Bereits die alleinige Aktivität der Cre Rekombinase führte zu dramatischen embryonalen Entwicklungsdefekten durch eine erhöhte Apoptose in den embryonalen Geweben (Naiche und Papaioannou, 2007). In Zellkulturversuchen führte eine hohe Cre Expression zur Wachstumsinhibition und DNA-Schäden im Genom (Loonstra et al., 2001). In transgenen Mäusen induzierte eine hohe Cre Expression chromosomale Rearrangements in Spermatisden, die eine männlichen Sterilität zur Folge hatten (Schmidt et al., 2000). Im Säugetiergenom wurden pseudo-loxP Seiten identifiziert, die ebenfalls der Rekombination durch die Cre-Rekombinase zugänglich sind (Thyagarajan et al., 2000). Diese unerwünschten Effekte der Expression der Cre-Rekombinase in transgenen Tieren oder in Zellen verlangen sorgfältig kontrollierte Experimente. Die seit kurzem verwendeten Cre-Rekombinasen in transgenen Tiermodellen sind so konstruiert, dass sie

einem sich-selbst-inaktivierenden Mechanismus unterliegen und damit die Zytotoxizität der Cre-Rekombinasen senken (Pfeifer et al., 2001). Die in meinem untersuchten Mausmodell vorhandene Cre-ER<sup>T2</sup>-Rekombinase des RERTn Maus-Stammes ist nur in Gegenwart von 4-OHT aktiv. Somit werden potentielle unerwünschte Effekte der Cre-Rekombinase Aktivität vermieden.

Nachteil des Cre-Rekombinase Systems ist, dass es nach Induktion der Cre Rekombinase irreversibel ist (Mattaei, 2007). Ein reversibles System dagegen ist das Tetracyclin response System, bei dem eine räumliche und zeitliche Kontrolle der Genexpression möglich ist.

#### 5.2.4 Bedeutung der Ergebnisse für den zukünftigen Einsatz des konditionellen Mausmodells

Die konditionelle systemische Rekombination von  $p300^{AS}$  konnte in doppelt heterozygoten Mäusen in multiplen Geweben induziert werden. Allerdings wurde für das erste Austesten des loxP-Systems die „Background-Aktivität“ der Cre-Rekombinase nicht untersucht. Andere Arbeitsgruppen konnten in ihren Cre Reportersystemen eine geringfügige Hintergrundaktivität in Abwesenheit des Liganden nachweisen (Erdmann et al., 2007). Hierzu müsste man ein doppelt heterozygoten Tier für  $p300^{+/AS}; CreER^{T2}$  ohne Tamoxifen Applikation analysieren. Das entwickelte konditionelle Maus – Modell wird sich sehr gut eignen, die Frage nach der Tumorsuppressor-Funktion von p300 in den unterschiedlichen Organen beantworten zu können. Die Möglichkeit am erwachsenen Tier die  $p300$  Mutation mit dominant negativer Wirkung induzieren zu können, erlaubt erst die Analyse weiterer Funktionen der Acetyltransferase p300, da die Letalität in der Embryonalentwicklung bei  $p300^{AS}$  exprimierenden Tieren umgangen wird. Mit Hilfe des ausgetesteten konditionellen Mausmodells kann der Einfluss der enzymatischen Aktivität von p300 auf die Entstehung von Tumoren in den unterschiedlichen Geweben analysiert werden.

## 6 Zusammenfassung

### 6.1.1 Zusammenfassung: FoxO Transkriptionsfaktoren als Ziel von E2F-1

In vielen Tumoren, wie auch den Neuroblastomen, liegt häufig eine Dysregulation von Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie vor, die mit einer Überexpression von E2F-Zielgenen (*MYCN*, *MAD*) assoziiert ist und mit einem aggressiven Krankheitsverlauf korreliert. Veränderungen in der Signalkaskade, die E2F reguliert, sowie Änderungen in der Expression von E2F-Zielgenen sind wichtige molekularbiologische Marker der Tumordiagnostik, die neben klinischen Parametern die Therapieoptionen beeinflussen. Somit ist die Identifizierung von weiteren E2F-Zielgenen als potentielle molekularbiologische Marker von großem Interesse.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, *FOXO1* als ein Zielgen von E2F-1 in Neuroblastomzellen zu verifizieren. Der *FOXO1* Promotor verfügt über drei potentielle Bindungsstellen für E2F und ist somit einer Bindung durch E2F Transkriptionsfaktoren zugänglich. Im transienten Assay erfolgte eine Aktivierung des *FOXO1* Promotors durch E2F-1, E2F-2 und E2F-3 („aktivierende E2Fs). Ein durch 4-OHT aktiviertes E2F-1-ER Fusionsprotein konnte in der Gegenwart des Proteinbiosynthese-Inhibitors Cycloheximid die Genexpression von *FOXO1* und *FOXO3A* induzieren. Auch *in vivo* konnte mit Hilfe von Chromatin-Immunopräzipitationsexperimenten die Bindung von E2F-1 an den *FOXO1* Promotor in Neuroblastomzellen nachgewiesen werden. Diese Befunde sprechen dafür, dass *FOXO* ein direktes Zielgen von E2F-1 ist. Die Expression der *FOXO* Gene wird allerdings nicht wie klassische E2F-Zielgene in Abhängigkeit von Zellzyklus-Stadien reguliert.

E2F-1, als ein Schlüsselregulator des Zellzyklus, konnte in der vorliegenden Arbeit als erster Transkriptionsfaktor identifiziert werden, der die Expression von *FOXO* reguliert. Dieses Ergebnis verknüpft in Neuroblastomzellen den E2F-Signalweg mit dem PI3K/Akt/FoxO Signalweg. In Neuroblastomen wurde sowohl eine dysregulierte E2F-Aktivität, als auch eine Dysregulation des PI3K/Akt Signalweges nachgewiesen, die mit einer schlechten Prognose für die Patienten korrelieren. FoxO ist ein gemeinsames Ziel beider Signalwege. Entsprechend könnte eine abnorme FoxO-Aktivität zur Entstehung von Neuroblastomen beitragen.

### 6.1.2 Zusammenfassung: Induzierbare systemische Rekombination eines konditionellen Allels in der Maus

Im zweiten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, wie effizient ein mutiertes Allel von p300 in der Maus durch ein induzierbares CreER Fusionsprotein rekombiniert wird. Dazu wurden doppelt heterozygote  $p300^{+/ASneo}; CreER^{+/T2}$  Mäuse verwendet. Die Mäuse verfügen über eine Mutation zweier benachbarter Aminosäuren der Acetyltransferase Domäne des p300 Proteins. Das von dem mutierten Allel kodierte acetylase-defiziente p300 hat eine dominant negative Wirkung. Durch die Anwesenheit eines *neo*-Gens in dem mutierten Allel kommt es zu Repression des mutierten  $p300^{AS}$ -Allels. Die Mäuse sind ebenfalls heterozygot für ein Tamoxifen induzierbares CreER<sup>T2</sup> Fusionsprotein, welches ubiquitär in der Maus exprimiert wird. Durch Behandlung der Mäuse mit 4-OHT, einen Tamoxifen-Metaboliten, kann das neo Gen entfernt werden und es kommt zur systemischen/ubiquitären Expression des mutierten Allels von p300. In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, wie effizient nach 4-OHT-Behandlung die Rekombination durch das CreER in verschiedenen Geweben der Maus erfolgt. Zu diesem Zweck wurden erwachsene Mäuse vier Tage lang mit Tamoxifen i.p. injiziert. 10 Tage, 3 Monate und 6 Monate nach der Injektion wurde die Rekombination des geflochtenen  $p300^{AS}$ -Allels in 23 verschiedenen Organen und Geweben mit einer allel-spezifischen qRT-PCR überprüft. Die Rekombination des mutierten p300-Allels konnte in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Die Rekombinationseffizienz lag in den meisten Geweben zwischen 40 und 60%.

Auf der Basis dieser Experimente kann dieser Ansatz nun verwendet werden, um die Tumorsuppressorfunktion von p300 *in vivo* zu untersuchen.

## 7 Literaturverzeichnis

ABI PRISM 7700 Sequence Detection System: User Bullentin #2, Applied Biosystems

Accili, D. und Arden, K.C. (2004): FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation , and transformation. *Cell*, 117, 421-426

Adams, P.D. und Kaelin, W.J. (1996): The cellular effects of E2F overexpression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 208, 79-83

Agger, K., Santoni-Rugiu, E., Holmberg, C., Karlström, O. und Helin, K. (2005): Conditional E2F1 activation in transgenic mice causes testicular atrophy and dysplasia mimicking human CIS. *Oncogene*, 24, 780-789

Anderson, M.W., Reynolds, S.H., You, M., und Maronpot, R.M. (1992): Role of Proto-oncogene Activation in Carcinogenesis. *Environmental health Perspectives*, Vol. 98, 13-24

Arden, K.C. (2006): Multiple roles of FOXO transcription factors in mammalian cells point to multiple roles in cancer. *Exp. Gerontology* 41, 709-717

Arden, K.C. (2008): FOXO animal models reveal a variety of diverse roles for FOXO transcription factors. *Oncogene*, 27, 2345-2350

Aslanian, A., Laquinta, P.J., Verona, R. und Lees, J.A. (2004): Repression of the *Arf* tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics. *Genes & Development*, 18, 1413-1422

Attwooll C., Denchi,E.L. und Helin K. (2004): The E2F family: specific functions and overlapping interests. *The EMBO Journal* 23, 4709-4716

Badros, A. Z. , ( 2005 ) : Phase II study of G3139, a Bcl - 2 antisense Oligonucleotide , in combination with dexamethasone and thalidomide in

relapsed multiple myeloma patients. *J. Clin. Oncol.* 23, 4089-4099

Bandara, L.R., Buck, V.M., Zamanian, M., Johnston, L.H. und La Thangue, N.B. (1993): Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcriptionfactor DRTF1/E2F. *The EMBO Journal*,12, 4317-4324

Bannister, A.J. und Kouzarides, T. (1996): The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*, 384, 641-643

Barthelemy,C., Henderson, C. E. und Pettmann, B. (2004): Foxo3a induces motoneuron death through the Fas pathway in cooperation with JNK. *BMC Neuroscience*, 5:48

Beckman, K.B., und Ames, B.N. (1998): The free radical theory of aging matures. *Physiol. Rev.* 78, 547-581

Bell, L.A. und Ryan, K.M. (2004): Life and death decisions by E2F-1. *Cell Death Differ.*, 2004, 11 (2), 137-142

Bell, L.A., O'Prey, J. und Ryan, K.M. (2006): DNA –binding independent cell death from a mimal proapoptotic region of E2F-1. *Oncogene*, 14; 25 (41), 5656-5663

Bieda, M., Xiaoquin, X., Singer, M.A., Green, R. und Farnham, P.J. (2006): Unbiased location analysis of E2F1-binding sites suggests a widespread role for E2F1 in the human genome. *Genome Research*, 16, 595-605

Biggs III, W.H., Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K. und Arden, K.C. (1999): Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 7421-7426

Biswas S.C., Liu, D.X. und Greene, L.A. (2005): Bim is a direct Target of a Neuronal E2F-Dependent Apoptotic Pathway. *J. Neurosci.* 25, 8349-8358

Blattner, C., Sparks, A. und Lane, D. ( 1999 ) : Transcription factor E2F - 1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Mol Cell. Biol.* 19,3704-3713

Bluher, M., Kahn, B.B., und Kahn C.R. (2003): Extend longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science*, 299, 572-574

Borkhardt, A., Repp, R., Haas, O.A., Leis, T., Harbott, J., Kreuder, J., Hammermann, J., Henn, T. und Lampert, F. (1997): Cloning and characterization of AFX, the gene fuses to Mll in acute leukemias with a (X;11) (q13;q23). *Oncogene*, 14, 195-202

Bouchard, C., Marquardt, J., Brás, A., Medema, R.H. und Eilers, M. (2004): Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *The EMBO Journal*, 23, 2830-2840

Bouillet, P., Zhang, L.C., Huang, D.C.S., Webb, G.C., Bottema, C. D.k., Shore, P., Eyre, H.J., Sutherland, G.R. und Adams, J.M. (2001): Gene structure, alternative splicing, and chromosomal localization of pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim. *Mammalian Genome*, 12, 163-168

Boveri, T. (1914): Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. *Jena: Fischer*

Bracken A.P., Ciro, M., Cocito, A. und Helin, K. (2004): E2F target genes: unraveling the biology. *Trends in Biochemical Sciences* Vol. 29 No. 8

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal biochem* 72, 248-254

Braeckman, B.P., Houthoofd, K. und Vanfleteren, J.R. (2001): Insulin-like signaling, metabolism, stress resistance and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanismus of Ageing and Development*, 122, 673-693

Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A. H. F. M., Schlegelberger, B., Stein, H., Dörken, B., Jenuwein, T. und Schmitt, C.A. (2005): Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*, Vol. 436, 660-665

Branda, C.S. und Dymecki, S.M. (2004): Talking about a Revolution: the Impact of Site-specific Recombinases on Genetic Analyses in mice. *Developmental Cell*, Vol.6, 7-28

Brinkschmidt, C., Poremba, C., Christiansen, H., Simon, R., Schafer, K.L., Terpe, H.J., Lampert, F., Boecker, W., Dockhorn-Dworniczak, B. (1998): Comparative genomic hybridization and telomerase activity analysis identify two biologically different groups of 4s neuroblastomas. *Br. J. Cancer*, 77, 2223-2229

Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Barrett, A., Berthold, F., Castleberry, R.P., D'Angio, G., De Bernardi, B., Evans, A.E., Favrot, M., Freeman, A.I., Haase, G., Hartmann, O., Hayes, F.A., Helson, L., Kemshead, J., Lampert, F., Ninane, J., Ohkawa, H., Philip, T., Pinkerton, C.R., Pritchard, J., Sawada, T., Siegel, S., Smith, E.I., Tsuchida, Y. und Voute, P.A. (1988): International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol*, 6, 1874-1881

Brownawell, A.M., Kops, G.J., Macara, I.G. und Burgering, B.M. (2001): Inhibition of nuclear import by protein kinase b (akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Mol. Cell. Biol.*, 156, 817-828

Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. und Greenberg, M.E. (1999): Akt Promotes Cell survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor. *Cell* Vol. 96, 857-868

Brunet, A., Park, J., Tran, H., Hu, L.S., Hemmings, B.A. und Greenberg, M.E. (2001): Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating

the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol. Cell. Biol.*, 21, 952-965

Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.I., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., Hu, L.S., Cheng, H.-L., Jedrychowski, M.P., Gygi, S. P., Sinclair, D.A., Alt, F.W. und Greenberg, M.E. (2004): Stress-dependent regulation of FOXO transcription-factors by SIRT1 deacetylase. *Science* 303,2011-2015

Burcham, P.C. (1998): Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism. *Mutat. Res.*, 443, 11-36

Burgering B.M.T. und Kops G.J.P.L. (2002): Cell cycle and death control: long live Forkheads. *TRENDS in Biochemical science* Vol.27, No.7, 352-360

Burgering, B.M.T. und Medema, R.H. (2003): Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *Journal of Leucocyte Biology* Vol. 73, 689-701

Calle, E.E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K. and Thun, M.J. (2003): Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N.Engl.J.Med.* 348, 1625-1638

Calman, D.R. und Brunet, A. (2008): The FoxO code. *Oncogene*, 27, 2276-2288

Cam, H. und Dynlacht, B.D. (2003): Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer cell*, 3 (4), 311-316

Campisi, J. (2001): Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends in Cell Biology*, Vol. 11, No.11, S27-S31

Campisi, J. (2003): Cancer And Ageing: Rival Demons? *Nature*, Vol. 3, 339-349

Caron, H.(1995): Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17

material are both unfavourable prognostic markers in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol*, 24, 215-221

Caron, H., Van sluis, P., De Kraker, J., Bökkerink, J., Egeler, M., Laureys, G., Slater, R., Westerveld, A., Voute, P.A., Versteeg R. (1996): Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N.Engl.J.Med.*, 334, 225-230

Casanova E., Fehsenfeld, S., Lemberger, T., Shimshek, D.R., Sprengel, R., und Mamadiotis, T. (2002): ER-based double iCre fusion protein allows partial recombination in forebrain. *Genesis* 34, 208-214

Cayirlioglu, P., Bonette, P.C., Dickson, M.R. und Duronio, R.J. (2001): *Drosophila E2F2* promotes the conversion from genomic DNA replication to gene amplification in ovarian follicle cells. *Development*, 128, 5085-5098

Chan, H.M. und La Thangue, N.B. (2001): p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J. Cell. Sci.*, 114, 2363-2373

Chaussepied, M. und Ginsberg, D. (2004): Transcriptional regulation of AKT activation by E2F. *Mol. Cell*, 16, 831-837

Chellappan, S.P., Hiebert, S., Mudryi, M., Horowitz, J.M. und Nevins, J.R. (1991) The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65, 1053-10

Christiansen, H. und Lampert, F. (1988): Tumour karyotype discriminates between good and bad prognostic outcome in neuroblastoma. *Br. J.Cancer*, 57, 121-126

Cohen-Tannoudji, M., Babinet, C. und Morello, D. (2000): *lacZ* and ubiquitously expressed genes: should divorce be pronounced. *Transgenic Research*, 9, 233-235

Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguría, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., Beach, D. und Serrano, M. (2005): Senescence in premalignant tumours. *Nature*, Vol. 436, 642

Cooper, C.S. (2007): Role of E2F3 Expression in modulating cellular proliferation rate in human bladder and prostate cancer cells. *Oncogene*, 26, 1028-1037

Cress, W.D., Johnson, D.G. und Nevins, J.R. (1993): A Genetic Analysis of the E2F1 Gene Distinguishes Regulation by Rb, p107, and Adenovirus E4. *Molecular and Cellular Biology*, Vol.13, No. 10, 6314-6325

Crewe, H.K., Ellis, S.W., Lennard, M.S., und Tucker, G.T. (1997): Variable Contribution of Cytochromes P450 2D6, 2C9 and 3A4 to the 4-Hydroxylation of Tamoxifen by Human Liver Microsomes. *Biochemical Pharmacology*, Vol. 53, 171-178

Crewe, H.K., Notley, L.M., Wunsch, R.M., Lennard, M.S. und Gillam, E.M. (2002): METABOLISM OF TAMOXIFEN BY RECOMBINANT HUMAN CYTOCHROME P450 ENZYMES: FORMATION OF THE 4-HYDROXY, 4'-HYDROXY AND N-DESMETHYL METABOLITES AND ISOMERIZATION OF *trans*-4-HYDROXYTAMOXIFEN. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 30, No. 8 869-874

Dehal, S.S und Kupfer, D. (1997): CYP2D6 Catalyzes Tamoxifen 4-Hydroxylation in Human Liver. *Cancer Research*, 57, 3402-3406

Danielian, P.S., White, R., Hoare, S.A., Fawell, S.E. und Parker, M.G. (1993): Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen. *Mol. Endocrinol.*, 7 (2), 232-240

Davis, R.J., D´Cruz, C.M., Lovell, M.A., Biegel, J.A. und Barr, F.G. (1994): Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13) (p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.*, 54, 2869-2872

DeGregori, J., Kowalik, T. und Nevins, J.R. (1995): Cellular Targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA Synthesis- and G<sub>1</sub>/S-Regulatory genes. *Molecular And Cellular Biology*, 4215-4224

DeGregori, J. (2002): The genetics of the E2F family of transcription factors: shared Functions and unique roles. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1602, 131-150

Dijkers, P.F., Medema, R.H., Lammers, J.-W., J., Koenderman, L. und Coffey, P.J. (2000): Expression of the proapoptotic Bcl-2 family member Bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. *Curr. Biol.* 10, 1201-1204

Dijkers, P.F., Birkenkamp, K.U., Lam, E.W., Thomas, N.S., Lammers, J.W., Koenderman, L. und Coffey, P.J. (2002): FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal : protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J.Cell. Biol.*, 156, 531-542

Dimova, D.K., Stevaux, O., Frolov, M.V. und Dyson, N.J. (2003): Cell cycle-dependent and cell cycle-independent control of the transcription by the *Drosophila* E2F/RB Pathway. *Genes & Development*, 17, 2308-2320

Dimova, D.K. und Dyson, N.J. (2005): The E2F transcriptional network: old acquaintance with new faces. *Oncogene*, 24, 2810-2826

Drake, J.W., Charlesworth, B., Charlesworth, D. und Crow, J.F. (1998): Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, 148, 1667-1686

Du, W. und Pogriler J. (2006): Retinoblastoma family genes. *Oncogene* 25, 5190-5200

Dynlacht B.D., Flores, O., Lees, J.A. und Harlow, E. (1994): differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes. *Genes & Development*, 15, 1772-1786

Dyson, N., Howley, P.M., munger, K. und Harlow, E. (1989): The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243, 934-937

Dyson, N. (1998): The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes & Development* 12; 2245-2262

Ebihara, Y., Miyamoto, M., Shinobe, T., Kawarada, Y., Cho, Y., Fukunaga, A., Murakami, S., Uehara, H., Kaneko, H., Hashimoto, H., Murakami, Y., Itoh, T., Okushiba, S., Kondo, S. und Katoh, H. (2004): Over-expression of E2F-1 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with tumor progression. *Diseases of Esophagus*, 17, 150-154

Eckner, R., Arany, Z., Ewen, M., Sellers, W. und Livingston, D.M. (1994): The adenovirus E1A-associated 300-kD protein exhibits properties of a transcriptional co activator and belongs to an evolutionarily conserved family. *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol.*, 59, 85-95

Eggert, A. (2005): Prediction of clinical outcome and biological characterization of neuroblastoma by expression profiling. 24, 79\*2/7912

Ensinck, A., Biondi, C.S., Marini, A., García Borràs, L.L. Racca, Cotorruelo, C.M., A.L., Racca (2006): Effect of membrane-bound IgG and desialysation in the interaction of monocytes with senescent erythrocytes. *Clin. Exp. Med.*, &, 138-142

Erdmann, G., Schütz, G. und Berger, S. (2007): Inducible gene inactivation in neurons of the adult mouse forebrain. *BMC Neurosci.*, 2, 8, 63

Essers, M. A.-G., Weijzen, S., de Vries-Smits, A. M.-M., de Ruiter, N.D., Bos, J.L. und Burgering, B.M.T. (2004): FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *The EMBO Journal*, 23, 4802-4812

Eymin. B., Gazzeri, S., Brambilla, C. und Brambilla, E. (2001): Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma. *Oncogene*, 20, 1678-1687

Fajas, L., Landsberg, R.L., Huss-Garcia, Y., Sardet, C., Lees, J.A. und Auwerx,

J. (2002): E2Fs Regulate Adipocyte Differentiation. *Developmental Cell*, 3, 39-49

Feber, A., Clark, J., Goodwin, G., Dodson, A.R., Smith, P.H., Fletcher, A., Edwards, S., Flohr, P., Falconer, A., Roe, T., Kovacs, G., Dennis, N., Fisher, C., Wooster, R., Huddart, R., Foster, C.S. und Cooper, C.S. (2004): amplification and overexpression of E2F3 in human bladder cancer. *Oncogene*, 23, 1627-1630

Feil, R., Brocard, J., Mascrez, B., LeMeur, M., Metzger, D. und Chambon, P. (1996) : Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 93, 10887-10890

Feil, R., Wagner, J., Metzger, D. und Chambon, P. (1997): Regulation of Cre Recombinase Activity by Mutated Estrogen Receptor Ligand-Binding Domains. *Biochem. And Biophys. Research Communications*, 237, 752-757

Foster, C.S., Falconer, A., Dodson, A.R., Norman, A.R., Dennis, N., Fletcher, A., Southgate, C., Dowe, A., Dearnaley, D., Jhavar, S., Eeles, R., Feber, A. und Cooper, C.S. (2004): Transcription factor E2F3 overexpressed in prostate cancer independently predicts clinical outcome. *Oncogene*, 23, 5871-5879

Friend, S.H., Bernards, R., Rogelji, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M. und Dryja, T.P. (1986): A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, 323, 643-646

Fung, Y.K., Murphree, A.L., TÁng, A., Qian, J., Hinrichs, S.H. und Benedict, W.F. (1987): Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene. *Science*, 236, 1657-1661

Furuyama, T., Nakazawa, T., Nakano, I. und Mori, N. (2000): Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem.J.*, 349, 629-634.

Furuyama, T., Kitayama, K., Shimoda, Y., Ogawa, M., Sone, k., Yoshida-Araki,

K., Hisatsune, H., Nishikawa, S., Nakayama, K., Ikeda, K., et al. (2004): Abnormal angiogenesis in Foxo1 (Fkhr)-deficient mice. *J. Biol. Chem.*, 279, 34741-34749

Galili, N., Davis, R.J., Fredericks, W.J., Mukhopadhyay, S., rausder, F.J.<sup>3rd</sup>, Emanuel, B.S., Rovera und Barr, F.G. (1993): Fusion of fork head domain gene to PAX3 in the solid alveolar rhabdomyosarcoma. *Na.Genet.*, 5, 230-235

Gayther, S.A., Batley, S.J., Linger, L., Bannister, A., Thorpe, K., Chin, S.-F., Daigo, Y., Russell, P., Wilson, A., Sowter, H.M., Delhanty, J.D.A., Ponder, B., A., J., Kouzarides, T. und Caldas, C. (2000): Mutations truncating the EP300acetylase in human cancers. *Nature Genetics*, Vol. 24, 300-303

Giannakou, M.E. und Partridge, L. (2004): The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *TRENDS in Cell Biology*, Vol.14, No.8

Ginsberg, D., Vairo, G., Chittenden, T., Xiao, Z.X., Xu, G., Wydner, K.L., DeCaprio, J.A., Lawrence, J.B. und Livingston D.M. (1994): E2F-4, a new member of the E2F transcription factor family, interacts with p107. *Genes Dev.*, Vol. 8, 2665-2679

Ginsberg, D. (2002): E2F1 pathways to apoptosis. *FEBS Lett.* 529, 122-125

Gilley, J., Coffey, P.J. und Ham J. (2003): FOXO transcription factors directly activate *bim* gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *JCB* Vol.126, No. 4,613-622

Girling, R., Patridge, J.F., Banara, L.R., Burden, N., Totty, N.F., Hsuan, J.J. und LaThangue, N.B. (1993a): A new component of the transcription factor DRTF1/E2F. *Nature*, 4, 83-87

Girling, R., Bandara, L.R., Zamanian, M., Sorensen, T.S., Xh, F.H., La Thangue, M.B. (1993b): DRTFI/E2F transcription factor ; an integrator of cell –

cycle events with the transcriptional apparatuses. *Biochem. Soc. Trans.*, 21, 939-42

Goodrich, D.W., Way, N.P., Qian, Y.W., Lee, E.Y. und Lee, W.H. (1991): The retinoblastoma gene produkt regulates progression through the G1 phase of the cell cycle. *Cell* 67, 293-302

Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., mariatos, G., kotsinas, A., Bouda, m., Kletas, D., Asimacopoulos, P.J., Agnantis, n., Kittas, C. und Papavassiliou, A.G. (2002): Trancription factor E2F-1 acts as a growth-promoting factor and is associated with adverse prognosis in non-small cell lung carcinomas. *Journal of Pathology*, 198, 142-156

Gouyer, V., Gazzéri, S., Bolon, I., Drevet, C., Brambilla, C. und Brambilla, E. (1998): Mechanism of Retinoblastoma Gene Inactivation in the Spectrum of neuroendocrine Lung Tumors. *Am. J. Respiratory Cell and Molecular Biology*, Vol. 18, 188-196

Greer, E.L. und Brunet, A. (2005): FOXO transcriptionfactors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene* 24, 7410-7425

Greer, E.L. und Brunet, A. (2008): FOXO transcription factor in aging and Cancer. *Acta physiol. (Oxf.)*; 192 (1), 19-28

Gu, W. und Roeder, G. (1997): Activation of p53 Sequence-Specific DNA Binding by Acetylation of the p53 C-Terminal Domain. *Cell*, Vol. 90, 595-606

Guarente, L. und Kenyon, C. (2000): Genetic pathways that regulate ageing in model organismus. *Nature*, 408, 255-262

Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V. und Barbacid, M. (2003): Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly depentent on cellular context. *Cancer Cell*, 4 (2), 111-120

Guo,C., Yang, W. und Lobe, C.G. (2002): A Cre Recombinase Transgene with Mosaic, Widespread Tamoxifen-Inducible Action. *Genesis*, 32, 8-18

Hallstrom, T.C. und Nevins, J.R. (2003): specificity in the activation and control of transcription factor E2F-dependent apoptosis. *PNAS*, Vol. 100, No. 19, 10848-10853

Hamilton, D.L. und Abremski, K. (1984): Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J. Mol. Biol.*, 178, 481-486

Han, S., Park, K., Bae, B.-N., Kim, K.H., Kim, H.-J., Kim, Y.-D. und Kim, H.-Y. (2003): E2F1 expression is related with the poor survival of lymph node – positive breast cancer patients treated with fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide. *Breast Cancer Research and Treatment*, 82, 11-16

Hanaham, D. und Weinberg, R.A. (2000): The Hallmarks of Cancer. *Cell*, Vol. 100, 57-70

Harley, C.B., Futcher, A.B und Greider, C.W. (1990): Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, Vol. 345, No. 6274, 458-460

Harrisons Innere Medizin, ABW-Wissenschaftsverlag, 2002

zur Hausen, H. (1999): Viruses in Human Cancers. *Eur. J. of Cancer*, Vol. 35, No. 14, 1878-1885

Hayashi, S. und Mc Mahon, A.P. (2002): Efficient Rekombination in Diverse Tissues by a Tamoxifen - Inducible Form of Cre: A Tool for Temporally Regulated Gene Activation/Inactivation in the Mouse. *Developmental Biology*, 244, 305-318

Hayflick, L. und Moorhead, P.S. (1961): The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, Vol. 25, 585-621

van der Heide, L.P., Hoekman, M.F.M. und Schmidt, M.S. (2004): The Ins and Outs of FoxO Shuttling: Mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochemical Journal Immediate Publication*

Helin, K., Harlow, E. und Fattaey, A. (1993): Inhibition of E2F-1 Transactivation by Direct Binding of the Retinoblastoma Protein. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 13, No. 10. 6501-6508

Helin, K. (1998): Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8, 28-35

Helin, K. und Harlow, E. (1994): Heterodimerization of the transcription Factors E2F-1 and DP-1 Is Required for Binding to the Adenovirus E4 (ORF6/7) Protein. *J. Virology*, 5027-5035

Henderson, S.T. und Johnson, T.E. (2001): daf-16 integrates development and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology*, 11, 1975-1980

Henry, M.C.W., Tashjian, D.B. und Breuer, C.K. (2005): Neuroblastoma update. *Current Opinion in Oncology*, 17, 19-23

Hernando, E., Nahlé, Z., Juan, G., Diaz-Rodriguez, E., Alaminos, M., Hemann, M., Michel, L., Mittal, V., Gerald, W., Benezra, R., Lowe, S.W. und Cordeiro, C. (2004): Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature*, vol. 430, 797-802

Herold, G. (2003): Innere Medizin. Herausgeber: Gerd, Herold, Köln

Hershko T. und Ginsberg D. (2003): Up-regulation of Bcl-2 Homology 3 (BH3)-only Proteins by E2F1 mediates Apoptosis. *J.Biol. Chem.* Vol. 279, No. 10, 8627-8634

Hillion, J., Le Coniat, M., Jouveaux, P., Berger, R. und Bernard, O.A. (1997) :

AF6 ;21 a Novel Partner of the MLL gene in t(8;11) (q21 ;q23) defines a Forkhead transcriptional Factor Subfamily. *Blood*, 90, 3714-3719

Ho, K.K., Myatt und Lam, E.W.-F., (2008): Many forks in the path: cycling with FoxO. *Oncogene*, 27, 2300-2311

Holmberg, C., Helin, K., Sehested, M. und Karlström, O. (1995): E2F-1 induced p53-independent apoptosis in transgenic mice. *Oncogene* 17,143-155

Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Geloën, A., Even, P.C., Cervera, P., Le Bouc. (2003) : IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature*, 421, 182-187

Holtz-Heppelmann, C.J., Algeciras, A., Badley, A.D. und Paya, C.V. (1998): Transcriptional Regulation of the Human FasL Promotor-Enhancer Region. *The Journal of Biological chemistry*, Vol 273, 20, 4416-4423

Honda, Y. und Honda, S. (2002): Oxidativer Stress and Life span Determination in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 959, 466-474

Horowitz, J.M., Park, S.-H., Bogenmann, E., Cheng, J.-C., Yandell, D.W., Kaye, F.J., Minna, J.D., Dryja, T.P. (1990): Frequent inactivation of the retinoblastoma anti-oncogene is restricted to a subset of human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 87, 2775-2779

Hosaka, T., Biggs, W.h., 3<sup>rd</sup>, Tieu, D., Boyer, A.D., Varki, N.M., Cavenee, W.K., Arden, K.C. (2004). Disruption of the forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc. Acad. Sci. USA*, 101, 2975-2980

Hottinger, M.O. und Nabel, G.J. (2000): Viral replication and the coactivators p300 and CBP. *Trends Microbiol.*, 8, 560-565

Ikeda, M.-A., Jakoi, L. und Nevins, J.R. (1996): A unique role for the Rb protein

in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 93, 3215-3320

Imae, M., Fu, Z., Yoshida, A., Noguchi, T. und Kato, H. (2003): Nutritional and hormonal factors control the gene expression of FoxOs, the mammalian homologues of DAF-16. *J. of Mol. Endocrinology*, 30, 253-262

Indra, A.K., Warot, X., Brocard, J., Bornert, J.-M., Xiao, J.-H., Chambon, P. und Metzger, D. (1999): Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER<sup>T</sup> and Cre-ER<sup>T2</sup> recombinase. *Nucleic Acids Research*, Vol. 27, No. 22, 4324-4327

Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M. und Nevins, J.R. (2001): Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol. Cell. Biol.*, 21 (14), 4684-4699

Ishikawa, J., Xu, H.-J., Yandell, D.W., Maeda, S., Kamidono, S., Benedict, W.F. und Takahashi, R. (1991): Inactivation of the Retinoblastoma Gene in human Bladder and Renal Cell Carcinomas. *Cancer Research*, 51, 5736-5743

Ito, A., Laj, C.H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M.H., Appella, E. und Yao, T.P. (2001): p300/CBP –mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *Embo J.*, 20, 1331-1340

Iyer, N.G., Xian, J., Chin, S. F., Bannister, A.J., Daigo, Y., Aparicio, S., Kouzarides, T. und Caldas, C. (2007): p300 is required for orderly G1/S transition in human cancer cells. *Oncogene*, 4, 26 (1), 21-29

Iwanaga, R., Komori, H., Ishida, S., Okamura, N., Nakayama, K., Nakayama, K.I. und Ohtani, K. (2006): Identification of novel E2F1 target genes regulated in cell cycle-dependent and independent manners. *Oncogene*, 25, 1786-1798

Johnson, D.G. und DeGregori, J. (2006): Putting the oncogenic and Tumor

- suppressive Activities of E2F into context. *Curr. Molecular Medicine*, 6, 731-738
- Jonkers, J. und Berns, A. (2002): Conditional Mouse Models of Sporadic Cancer. *Nature Reviews*, Vol. 2, 251-265
- Jooss, K., Lam, E.W., Bybee, A., girling, R., Muller, R. und La Thangque, N.B. (1995): Proto-oncogenic properties of the DP family of Proteins. *Oncogene*, 1995, 1529-1536
- Jullien, N., Goddard, I., Selmi-Ruby, S., Fina, J.-L., Cremer, H. und Herman, J-P. (2008): Use of ERT2-iCre-ERT2 for Conditional Transgenesis. *Genesis*, 46, 193-199
- Kaestner, K.H., Knöchel, W. and Martinez, D.E. (2000): Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes & Development* 14, 142-146
- Kaina, B. (2003): DNA damage-tirggert apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signalling. *Biochemicla Pharmacology*, 66, 1547-1554
- Karow, J.K., Wu, L. und Hickson, I.D. (2000): RecQ family helicases: roles in cancer and aging. *Curr. Opin. in Genetics & Development*, 10, 32-38
- Kastan, B. und Bartek, J. (2004): Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, Vol. 432, 317-323
- Kazakov, v.S., Demidchik, E.P. und Astakhova, L.N. (1992): Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature*, 359, 21
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A. und Tabtiang, A.C. (1993): *C.elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*, 366, 461-464
- Kiermayer, C., Conrad, M., Schneider, M., Schmidt, J. und Brielmeier, M. (2007):

Optimization of Spatiotemporal Gene Inactivation in Mouse Heart by Oral Applikation of Tamoxifen Citrate. *Genesis* 45, 11-16

Kim, J.-R., Jung, H.S., Bae, S.-W., Kim, J.H., Park, B.L., Choi, Y.H., Cho, H.Y., Cheong und H.S., Shin, H.D. (2006): Polymorphismus in *FOXO* Gene Family and Association Analysis with BMI. *Obesity*, Vol. 14, No. 2, 188-193

Kinzler, K.W und Vogelstein, B. (1997): Gatekeepers and caretakers. *Nature*, Vol. 386, 761-763

Kirkwood, T.B.L. und Austad, S.N. (2000): Why do we age ? *Nature*, Vol. 408, 233-238

Kishimoto, M., Kohno, T., Okudela, K., Otsuka, A., Sasaki, H., Tanabe, C., Sakiyama, T., Hirama, C., Kitabayashi, I., Minna, J.D., Takenoshita, S. und Yokota, J. (2005): Mutations and deletions of the CBP gene in human lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 15; 11(2Pt1), 512-519

Knudson, A.G. (1971): Mutation and Cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 820-823

Knudson, K.S., Buckmaster, C., Chen, T.-T., Feramisco, J.R. und Wang, J.Y.J. (1998): Inhibition of DNA synthesis by RB: effect on G<sub>1</sub>/S transition and S-phase progression. *Genes & Development*, 12, 2278-2292

Kodowaki, T., Hara, K., Yamauchi, T., Terauchi, Y., Tobe, K. und Nagai, R. (2003): Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp. Biol Med. (Maywood)*, 228, 1111-1117

Komori, H., Enomoto, M., Nakamura, M., Iwanaga, R. und Ohtani, K. (2005): Distinct E2F-mediated transcriptional program regulates p14ARF gene expression. *EMBO J.*, 24, (21), 3724-3736

Kops, G.J. P. L. , de Ruiter, N.D., De Vries-Smits, A.M., Powell, D.R., Bos, J.L. und Burgering, B.M. (1999): Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature*, 398, 680-634

Kops, G.J. P.L., Dansen, T.B., Poldermann, P.E., Saarloos, I., Wirtz, K.W.A., Coffey, P.J., Huang, T.-T., Bos, J.L., Medema, R.H. und Burgering, B. M. T. (2002): Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*, 419, 316-321

Kovesdi, I., Reichel, R. und Nevins, J.R. (1986) E1A transcription induction: enhanced binding of a factor to upstream promoter sequences. *Science*. 1986 Feb 14;231(4739):719-22

Kowalik, T.F., DeGregory, J., Schwarz, J.K. und Nevins, J.R. (1998): E2F1 Overexpression in Quiescent Fibroblasts Leads to Induction of Cellular DNA Synthesis and Apoptosis. *Journal of Virology*, 2491-2500

Kramps, C., Strieder, V., Sapetschnig, A., Suske, G. und Lutz, W. (2004): E2F and Sp1/Sp3 Synergize but Are Not sufficient to Activate the MYCN Gene in Neuroblastomas. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 7, 5510-5517

Krek, W., Ewen, M.E., Shirodkar, S., Arany, Z., Kaelin, W.G., Jr. und Livingston, D.M. (1994): Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound Cyclin A-dependent protein kinase. *Cell*, 78, 161-172

Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685

Lee, W.H., Bockstein, R., Hong, F., Young, L.J., Shew, J.Y. und Lee, E.Y. (1987): Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science*, 235, 1394-1399

Lees, J. A., Saito, M., Vidal, M., Valentine, M., Look, T., Harlow, E., Dyson, N.

und Helin, K. (1993): The Retionoblastoma Protein binds to a family of E2F Transcription Factors. *Molecular and Cellular biology*, Vol. 13, No.12, 7813-7825

Le-Niculescu, H., Bonfoco, E., Kasuya, y., Claret, F.X., Green, D.R. und Karin, M. (1999): Withdrawel of survivel factors results in activation of the JNK pathway in neuronal cells leading to Fas ligand induction and cell death. *Mol. Cell Biol.*, 19, 751-763

Lim, C.K., Yuan, Z.X., Lamb, J.H., White, I.n., De Matteis, F. und Smith, L.L. (1994): A comparative study of tamoxifen metabolism in female rat, mouse, and human liver microsomes. *Carcinogenesis*, 15 (4), 589-593

Lin, K., Hsin, H., Libina, N. und Kenyon, C. (2001): Regulation of the *Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF and germline signaling. *Nature Genetics*, Vol. 28, 139-145

Lindahl, T. und Wood, R.D. (1999): Quality Control by DNA Repair. *Science*, Vol. 286, 1897-1905

Lindeman, G.J., Gaubatz, S., Livingston, D.M. und Ginsberg, D. (1997): The subcellular localisation of E2F-4 is cell-cycle dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 5095-5100

Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Danielian, P.s., Parker, M.G. und Evan, G.I. (1995): A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res.*, 23 (10), 1686-90

Liu, L., Scolnick, D.M., Trievel, R.c., Bing Zhang, H., Marmorstein, R., Halazonetis T.D. und Berger, S.L. (1999): p53 sites Acetylated In Vitro by PCAF and p300 Are Acetylated In Vivo in Response to DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 19, No.2, 1202-1209

Livak, K. J. und Schmittgen T. D. (2001): Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Methode. *Methods*, 25, 402-408

Löffler, Petrides, (1998): Biochemie und Pathobiochemie, Kap. 9, 6. Auflage, Springer Verlag

Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, h.B., Al Allak, B., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A. und Jonkers, J. (2001): Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *PNAS*, Vol. 98, No. 16, 9209-9214

Lundberg, A.S. und Weinberg, R.A. (1999): Control of Cell Cycle and Apoptosis. *European Journal of Cancer*, Vol. 35, No.14, 1886-1894

Marnett, L.J. und Plastaras, J.P. (2001): Endogenous DNA damage and mutation. *Trends in Genetics*, Vol. 17, No. 4, 214-221

Martínez-Balbás, M.A., Bauer, U.-A., Nielson, S., Brehm, A. und Kouzarides, T. (2000): Regulation of E2F1 activity by acetylation. *J.EMBO*, Vol. 19, No. 4, 662-671

Mason, S.L., Loughran O. und La Thangue, N.B. (2002): p14(ARF) regulates E2F activity. *Oncogene*, 21 (27), 4220-4230

Matthaei, K.I. (2007): Genetically manipulated mice: a powerful tool with unsuspected caveats. *J. Physiol.*, 582.2, 481-488

Medema, R.H., Kops, G.J.P.L., Bos, J.L. und Burgering, B.M.T. (2000): AFX-like forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27<sup>kip1</sup>. *Nature*, 404, 782-787

Meng, R.D., Philipps, P. und El-Deiry, W.S. (1999) p53-independent increase in E2F-1 expression enhances the cytotoxic effects of etoposide and of adriamycin. *Int.J.Oncol.* 14, 5-15

Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Soengas, M.s., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M.A.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J. und Peeper, D.S. (2005): BRAF<sup>E600</sup> –associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, Vol. 436, 720-724

Michow, B. (1995): Elektrophorese in Theorie und Praxis. *De Gruyter*

Milton, A., Luoto, K., Ingram, L., Munro, S., Logan, N., Graham, A.L., Brummelkamp, T.R., Hijmans, E.M., Bernards, R. und La Thangue, N.B. (2006): A functionally distinct member of the DP family of E2F subunits. *Oncogene*, 25 25, 3212-3218

Moberg, K., Starz, M.A. und Lees, J.A. (1996): E2F-4 Switches from p130 to p107 and pRB in Response to Cell Cycle Reentry. *Molecular and Cellular Biology*, Vol.16, No. 4, 1436-1449

Mochizuki, H., Miura, M., Shimanda, T. und Mizuno, Y. (2002) Adeno-associated virus-mediated anti-apoptotic gene delivery: *in vivo* gene therapy for neurological disorders. *Methodes* 28,248-252

Modur, V., Nagarajan, R., Evers, B.M. und Milbrandt, J. (2002): FOXO Proteins Regulate Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis inducing Ligand Expression. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.277, No. 49, 47928-47937

Mohty, M., Yong, A.S., Szydlo, R.M., Apperley, J.F., und Melo, J.V. (2007): The polycomb group BMI1 gene is a molecular marker for predicting prognosis of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 110 (1), 380-383

Montoliu, L., Chávez, S. und Vidal, M. (2000): Variegation associated with *lacZ* in transgenic animals: a warning note. *Transgenic Research*, 9, 237-239

Morris, B. J. (2005): A forkhead in the road to longevity: the molecular basis of lifespan becomes clearer. *Journal of Hypertension*, 23, 1285-1309

Morris, E.J. und Dyson, N. (2001): Retionoblastoma protein partners. *Adv Cancer Res.*, 82, 1-14

Muñoz, J., Lácoz, P., Del mar Inda, M., Nistal, M., Pestaña, A., Encrículo, I.J. und Castresana, J.S.( 2004): Homozygous Deletion And Expression of PTEN And DMBT1 In Human Primary Neuroblastoma AND Cell Lines. *Int. J. Cancer*, 109, 673-679

Muraoka, M., Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Tanaka, K., Shitara, N., Chong, J.M., Iwama, T. und Miyaki, M. (1996): p300 gene alterations in colorectal and gastric carcinomas. *Oncogene*, 4, 12 (7), 1565-1569

Myster, D.L., Bonette, P.C. und Duronio, R.J. (2000) : A role for the DP subunit of the E2F transcription factor in axis determination during *Drosophila* oogenesis. *Development*, 127, 3249-3261

Nahle, Z., Polakoff, J., Davuluri, R.V., Mc Currach, M.E., Jacobson, M.D., Narita, M., Zhang, M.Q., Lazebnik, Y., Bar-Sagi, D. und Lowe, S.W. (2002): Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat. Cell Biol.* 4 (11), 859-864

Naiche, L.A. und Papaioannou, V.E. (2007): Cre activity causes widespread apoptosis and lethal anemia during embryonic development. *Genes*, 45 (12), 768-775

Nakamura, N., Ramaswamy, S., Vaquez, F., Signoretti, S., Loda, M. und Sellers, W. (2000): Forkhead Transcription Factors Are Critical Effectors of Cell Death and Cell Cycle Arrest Downstream of PTEN. *Molecular and Cellular Biology*, Vol.20, No.23, 8969-8982

Nemoto, S. und Finkel, T. ( 2002 ): Redox regulation of Forkhead proteins through a 66shc-Dependent signaling pathway. *Science*, 295,2450-2452

Nemoto, S., Fergusson, M.M. und Finkel, T. (2004): Nutrient Availability

Regulates SIRT1 Through a Forkhead-Dependent Pathway. *Science*, Vol. 306, 2105-2108

Nevins, J.R. (1992): E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoprotein. *Science* Oct.16; 258(5081): 424-429

Nevins, J.R. (2001): The Rb/E2F pathway and cancer. *Human molecular Genetics*, Vol. 10, no7, 699-703

Norbury, C. und Nurse, P. (1992): Animal Cell Cycles And Their Control. *Annu. Rev. Biochem.*, 61, 441-70

Nowak, K., Kerl, K., Fehr, D., Kramps, C., Gessner, C., Killmer, K., Samans, B., Berwanger, B., Christiansen, H. und Lutz, W. (2006): *BMI1* is a target gene of E2F-1 and is strongly expressed in primary neuroblastomas. *Nucleic Acids Research*, Vol. 34, No. 6, 1745-1754

Nowak, K., Killmer, K., Gessner, C. und Lutz, W. (2007): E2F-1 regulates expression of *FOXO1* and *FOXO3a*. *Biochimica et Biophysica acta*, 1769 (4), 244-152

Nowell, P.C. (1976): The clonal evolution of tumor cell population. *Science*, 194, 23-28

Obesil, T. und Obsilova, V. (2008): Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. *Oncogene*, 27, 2263-2275

Obexer, P., Geiger, K., Meister, B. und Ausserlechner, M.J. (2006): FKHL1-mediated expression of Noxa and Bim induces apoptosis via the mitochondria in neuroblastoma cells. *Cell Death and Differentiation*, 1- 14

O'Brien, R.M., Noisin, E.L., Suwanichkul, A., Yamasaki, T., Lucas, P.C., Wang, J.C., Powell, D.R. und Granner, D.K. (1995) : Hepatic nuclear factor 3 - and hormone-regulated expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase

and insulin-like growth factor- binding protein 1 genes. *Mol.Cell. Biol.*, 15, 1747-1758

Odgren, P.R., MacKay, C.A., Mason-Savas, A., Mailhot, G. und Birnbaum, M.J. (2006): False-positive beta-galactosidase staining in osteoclasts by endogenous enzyme: studies in neonatal and month-old wild-type mice. *Connect Tissue Res.*, 47, 229-234

Oeggerli, M., Schraml, P., Ruiz, C., Bloch, M., Novotny, H., Mirlacher, M., Sauter, G. und Simon, R. (2006): E2F3 is the main target gene of the 6p22 amplicon with high specificity for human bladder cancer. *Oncogene*, 25, 6538 - 6543

Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G.I., Lee, I., Tissenbaum, H.A. und Ruvkun, G. (1997): The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature*, Vol. 389, 994-999

Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard B.H. und Nakatani, Y. (1996): The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferasen. *Cell*, 87, 953-959

Oh, S.W., Mukhopadhyay, A., svzikapa, N., Jiang, F., Davis, R.J. und Tissenbaum H.A. (2005): JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 4494-4499

Ohtani K., DeGregori, J. und Nevins, J.R. (1995): Regulation of the Cyclin E gene by E2F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 12146-12150

Olsson, A.Y., Feber, A., Edwards, S., Te Poele, R., Giddings, I., Merson, S. und Cooper, C.S. (2007): Role of E2F3 expression in modulating cellular proliferation rate in human bladder and prostate cancer. *Oncogene*, 26 (7), 1028-1037

Olson, M.V., Johnson, D.G., Jiang, H., Xu, J., Alonso, M.M., Aldape, K.D., Fuller, G.N., Bekele, B.N., Yung, W.K., Gomez-Manzano, C. und Fueyo J. (2007): Transgenic E2F1 expression in the mouse brain induces a human-like bimodal pattern of tumors. *Cancer Res.*, 1; 67 (9), 4005-4009

Opel, D., Poremba, C., Simon, T., Debatin, K.M. und Fulda, S. ( 2007): Activation of Akt predicts poor outcome in neuroblastoma. *Cancer Res.*, 15; 67 (2), 735-745

Orlic, M., Spencer, C.E., Wang, I. und Gallie, B. (2006): Expression Analysis of 6p22 Genomic Gain in Retinoblastoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 45, 72-82

Ormondroyd, E., de la Luna, S. und La Thangue, N.B. (2006): A new member of DP family, DP-3, with distinct protein products suggests a regulating role for alternative splicing in the cell cycle transcription factor DRTF1/E2F. *Oncogene*, 1995, 11, 1437-46

Ortega, S., Malumbres, M., und Barbacid, M. (2002): Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochem. Biophys. Acta*, 1602, 73-87

Page, B.D., Guedes, S., Waring, D. und Priess, J.R. (2001): The *C. elegans* E2F- and DP-Related Proteins Are Required for Embryonic Asymmetry and Negatively Regulate Ras/MAPK Signaling. *Molecular Cell*, Vol.7, 451-460

Paige, A.J.W. (2003): Redefining tumour suppressor genes: exceptions to the two-hit hypothesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 2147-2163

Paik, J.-H., Kollipara, R., Chu, G., Ji, H., Xiao, Y., Ding, Z., Miao, L., Tothova, Z., Horner, J.W., Carrasco, D.R., Jiang, S., Gilliland, D.G., Chin, L., Wong, W.H., Castrillon, D.H. und DePinho, R. (2007): FoxOs Are Lineage-Restricted Redundant Tumor Suppressors and Regulate Endothelial Cell Homeostasis. *Cell*, 128, 309-323

Parry, P., Wei, Y. und Evans, G. (1994): Cloning and characterization of the t(X;11) breakpoint from a leukemic cell line identify a new member of the forkhead gene family. *Genes Chromosomes Cancer*, 11, 79-84

Pfaffl, M.W., (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOsprektrum*, 1/04, 10.Jahrgang, 92-95

Pfeifer, A., Brandon, E.P., Gage, F.H. und Verma, I.M. (2001): Delivery of the Cre recombinase by a self-deleting lentiviral vector: efficient gene targeting in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 25, 98 (20), 11450-11455

Pierce, A.M., Gimenz - Conti, I.B., Schneider - Bruossard, R., Martinez, L.A., Conti, C.J. und Johnson, D.G. (1998): Increased E2F1 Activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 8858-63

Pierce, A.M., Schneider-Broussard, R., Philhower, J. und Johnson, D.G. (1998): Differential Activities of E2F Family members: Unique functions in Regulating Transcription. *Molecular carcinogenesis*, 22, 190-198

Pierce, A.M., Schneider-Broussard, R., Gimenz-Conti, I.B., Russel, J.L., Conti, C.J. und Johnson, D.G. (1999): E2F1 Has Both Oncogenic and Tumor-Suppressive Properties in a Transgenic Model. *Molecular and Cellular Biology*, 6408-6414

Pines, J. (1993): Cyclin and cyclin dependent kinases take your partners. *TIBS*, 18, 195-197

Polager, S., Kalma, Y., Berkovich, E. und Ginsberg, D. (2002) : E2Fs up – Regulated expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. *Oncogene*, 21, 437-446

Pruschy, M. et al. (1999) E2F-1 has properties of a radiosensitizer and its regulation by cyclin A kinase is required for cell survival of fibrosarcoma cells

lacking p53. *Cell Growth Differ.* 10, 141-146

Reagan-Shaw, S. und Ahmad, N. (2006): RNA Interference-Mediated Deletion of Phosphoinositide 3-Kinase Activates Forkhead Box Class O Transcription Factors and induces Cell cycle Arrest and Apoptosis in Breast Carcinoma Cells. *Cancer Res.*, 66, 1062-1069

Reagan-Shaw, S. und Ahmad, N. (2007): The role of Forkhead-box Class O (FoxO) transcription factors in cancer: A target for the management of cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1-9

Ramaswamy, S. , Nakamura, N., Sansal, I. Bergeron, L. und Sellers, W. R. (2002): A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer cell* Vol.2, 81-91

Reed, J.C. (1999): Dyregulation of apoptosis in cancer. *J. Clin. Oncol.* , 17 (9), 2941-2953

Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R.A. und Dynlacht, B.D. (2002): E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G<sub>2</sub>/M checkpoints. *Genes & Development*, 16, 245-256

Rena, G., Guo, S., Cichy, S.C., Unterman, T.G. und Cohen, P. (1999): Phosphorylation of the transcription factor forkhead family member FKHR by protein kinase B. *J. Biol. Chem.*, 274, 17179-17183

Robinson, S.P., Langan-Fahey, S.m., Johnson, D.A. und Jordan, V.C. (1991): Metabolites, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of tamoxifen in rats and mice compared to the breast cancer patient. *Drug Metab. Dispos.*, 19, (1), 36-43

Roth, S.Y., Denu, J.M. und Allis, C.D. (2001): Histone Acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*, 70, 81-120

Roussel, M.F. (1999): The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene*, 18, 5311-5317

Rowland, B.D. und Bernards, R. (2006): Re-Evaluating Cell-Cycle Regulation by E2Fs. *Cell*, 127, 871-874

Ruas, M. und Peters, G. (1998): The p16<sup>INK4a</sup>/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *BBA Rev. Cancer*, 1378, F115-F177

Sanchez, I. und Dynlacht, B.D. (1996): Transcriptional control of the cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology*, 8, 318-324

Sarasin, A. (1999): The molecular pathway of ultraviolet-induced carcinogenesis. *Mutation Research*, 428, 5-10

Schmidt, E.E., Taylor, D.S., Prigge, J.R., Barnett, S. und Capecchi, M.R. (2000): Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *PNAS*, Vol. 97, No. 25, 13703-13707

Schmidt, M., Fernandez de Mattos, S., van der Horst, A., Klompmaker, R., Kops, G.J.P., Lam, E. W.-F., Burgering, B.M.T. und Medema, R.H. (2002): Cell cycle inhibition by FoxO Forkhead Transcription Factors involves Downregulation of Cyclin D. *Molecular and Cellular Biology*, 7842-7852

Schmidt-Supprian, M. und Rajewsky, K. (2007): Vagaries of conditional gene targeting. *Nature Immunology*, Vol.8, No. 7, 665-668

Schramm, A., Schulte, J.H., Klein-Hitpass, L., Havers, W., Sieverts, H., Berwanger, B., Christiansen, H., Warnat, P., Brors, B., Eils, J., Eils, R. und Eggert, A. (2005): Prediction of clinical outcome and biological characterization of neuroblastoma by expression profiling. *Oncogene*, 24 (53), 7902-7912

Schwarz, J.K. Devoto, S.H., Smith, E.J., Chellappan, S.P., Jakoi, L. und Nevins, J.R. (1993): Interactions of the p107 and Rb proteins with E2F during the

cellproliferation response. *The EMBO Journal*, Vol. 12, No.3, 1013-1020

Sedding, D.G. (2008): FoxO transcription factors in oxidative stress response and ageing – a new fork on the way to longevity. *Biol. Chem.*, Vol. 389, 279-283

Seeger, R.C., Brodeur, G.M., Sather, H., Dalton, A., Siegel, S.E., Wong, K.Y. und Hammond, D. (1985): Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med*, 313, 1111-1116

Seelan, R.S., Irwin, M., van der Stoop, P., Qian, C., Keln, W.G., Jr. und Liu, W. (2002): The Human p73 Promotor: Characterization and Identification of Functional E2F Binding Sites. *Neoplasia*, Vol.4, No.3, 195-203

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.e., beach, D. und Lowe, S.W. (1997): Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, Vol. 88, No. 5, 573-575

Sherr, L.J. (1996): Cancer cell cycles. *Science*, 274, 1672-6

Sherr, C.J. und Roberts, J.M. (1999): CDK inhibitors: positive and negative regulators of G<sub>1</sub>-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501-1512

Sherr, C.J. und McCormick, F. (2002): The RB and p53 pathway in cancer. *Cancer Cell*, Vol. 2, 103-112

Sherr C.J. (2004): Principles of tumor suppression. *Cell*, 23; 116, (2), 235-246

Shikama, N., Lutz, W., Kretschmar, R., Sauter, N., Roth, J.-F., Marino, S., Wittwer, J., Scheidweiler, A. und Eckner, R. (2003): Essential function of p300 acetyltransferase activity in heart, lung and small intestine formation. *EMBO J.*, 1,22 (19), 5175-5185

Shimada, M. und Nakanishi, M. (2006): DNA damage checkpoints and cancer.

*J Mol. Hist.*, 37, 253-260

Simpson, L. und Parson, R. (2001): PTEN: Life as a Tumor Suppressor. *Experimental Cell Research*, 264, 29-41

Stahl, M., Dijkers, P.F., Kops, G.J., Lens, S.m., Coffey, P.J., Burgering, B.M. und Medema, R.H. (2002): The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27KIP1 and Bim in response to IL-2. *J. Immunol.*, 168, 5024-5031

Stanelle, J. and Pützer, B.M. (2006): E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics. *Trends in Molecular Medicine*, Vol.12, no.4, 176-185

Strieder, V. und Lutz, W. (2003): E2F Proteins Regulate *MYCN* Expression in Neuroblastoma. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, No. 5, 2983-2989

Sunters A., Fernàdez de Mattos, S., Stahl M., Brosens, J.J., Zoumpoulidou, G., Saunders, C.A., Coffey, P.J., medema, R.H., Coombes, R.C. und Lam, E. W.-F. (2003): FoxO3a transcriptional Regulation of Bim Controls Apoptosis in Paclitaxel-treated Breast Cancer Cell Lines *J. Biol. Chem.* Vol. 278, No. 50, 49795-49805

Suzuki, A. und Hemmati-Brivanlou (2000): *Xenopus* Embryonic E2F Is Required for the Formation of Ventral and Posterior Cell Fates during Early Embryogenesis. *Molecular Cell*, 5, 217-229

Takaishi, H., Konishi, H., Matsuzaki, H., Ono, Y., Shirai, Y., Saito, N., Kitamura, T., Ogawa, W., Kasuga, M., Kikkawa, U. und Nishizuka, Y. (1999): Regulation of nuclear translocation of forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, 96, 11836-11841

Takahashi, Y., Rayman, J.B. und Dynlacht, B.D. (2000): Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate

activation and repression. *Genes & Development*, 14, 804-816

Tang E.D., Nuñez, G., Barr, F.G. und Guan, Kun-Liang (1999) Negative Regulation of the Forkhead Transcription Faktor FKHR by Akt. *J. Biol. Chem.* Vol. 274, No.24 16741-16746

Taubert S., Gorrini, C., Frank, S.R., Parisi, T., Fuchs, M., Chan, H.-M., Livingston, D.M. und Amati, B. (2004): E2F-Dependent Histone Acetylation and Recruitment of the Tip60 Acetyltransferase Complex to Chromatin in Late G<sub>1</sub>. *Molecular And Cellular Biology* Vol. 24, No.10, 4546-4556

Thyagarajan, B., Guimarães, M.J., Groth, A.C. und Calos, M.P. (2000) : Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene*, 244, 47-54

Tran H., Brunet, A., Grenier, J.M., Datta, S.R., Fornace, A.J. Jr., DiStefano, P.S., Chiang, L.W. und Greenberg, M.E. (2002): DNA Repair Pathway stimulated by the Forkhead transcription Factor FOXO3a Through the Gadd45 Protein. *Science* Vol. 296, 530-534

Trimarchi, J.M. und Lees, J. (2001): SIBLING RIVALRY IN THE E2F FAMILY. *Nature Reviews*, Vol. 3, 11-20

Unterman, T.G., Fareeduddin, A., Harris, M.A., Goswami, R.G., Porcella, A., Costa, R.H. und Lacson, R.G. (1994): Hepatocyte Nuclear Factor-3 (HNF-3 Binds to the Insulin Reponse Sequence in the IGF Binding Protein-1 (IGFBP-1) Promotor and enhances Promotor Function. *Biochemical and Biophysical research Communications*, Vol.203, No.3, 1835-1841

Velasco-Miguel, S., Buckbinder, L., Jean, p., Gelbert, L., Talbott, R., Laidlaw, J., Seizinger, B. und Kley, N. (1999): PA26, a novel target of the p53 tumor suppressor and member of the GADD family of the DNA damage and growth arrest inducible genes. *Oncogene*, 18, 127-137

Veltman, J.A., Fridlyand, J., pejavar, S., Olshen, A.B., Korkola, J.E., De Vries, S., Carroll, P., Kuo, w.-L., Pinkel, D., Albertson, D., Cordon-Cardo, C., Jain, A.N. und Waldman, F.M. (2003): Array-based Comparative Genomic Hybridisierung for Genome-wide Screening of DNA copy Number in Bladder Tumors. *Cancer Res.* 63, 2872-2880

Vigo, E., Müller, H., Prosperini, E., Hateboer, G., Cartwright, P., Moroni, M.C. und Helin, K. (1999): CDC25A phosphatase is a target of E2F and is required for efficient E2F-induced S-phase. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 6379-6395

Vitzthum, F., Geiger, G., Bisswanger, H., Brunner, H. und Bernhagen, J. (1999): A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. *Anal. Biochem.*, 276, 59-64

Vogelstein, B., Lane, d. und Levine, A.J. (2000): Surfing the p53 network. *Nature*, Vol. 408, 307-310

Vogt P.K., Jiang, H. und Aoki, M. (2005): Triple Layer Control, Phosphorylation, Acetylation and Ubiquitination of FOXO Proteins. *Cell* 4:7 908-913

Vooijs, M., Jonkers, J. und Berns, A. (2001): A highly efficient ligand-regulated Cre Rekombinase mouse line shows that LoxP recombination is Position dependent. *EMBO Reports*, Vol. 21, No. 41, 292-297

van der Vos und Coffey, P.J. (2008): FOXO-binding partners: it takes two to tango. *Oncogene*, 27, 2289-2299

Wang, C., Chen, L., Hou, X., Li, Z., Kabra, N., Ma, Y., Nemoto, T., Finkel, T., Gu, W., Cress, W.D. und Chen, J. (2006): Interactions between E2F1 and SirT1 regulate apoptotic response to DNA damage. *Nature Cell Biology*, Vol. 8, Nr.9, 1025-1031

Wang, M. C., Bohmann, D. und Jasper, H. (2003) : JNK Signaling Confers

Tolerance to Oxidative Stress and Extends Lifespan in *Drosophila*. *Developmental Cell*, Vol.5, 811-816

Wang, M.C., Bohmann, D. und Jasper, H. (2005): JNK Extends Life Span and Limits Growth by Antagonizing Cellular and Organism-Wide Responses to Insulin Signaling. *Cell*, Vol. 121, 115-125

Wassmann, K. und Benezra, R. (2001): Mitotic checkpoints: from yeast to cancer. *Curr. Opin. in Genetics & Development*, 11, 83-90

Weigel, D. und Jackle, H. (1990): The fork head domain: A novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? *Cell*, 63, 455-456

Weigelt, J., Climent, I., Dahlman-Wright, K. und Wikström, M. (2001): Solution Structure of the DNA Binding Domain of the Human forkhead Transcription Factor AFX (FOXO4). *Biochemistry*, 40, 5861-5869

Weinberg, R.A. (1989): Oncogenes, antioncogenes, and the molecular Bases of Multistep Carcinogenesis. *Cancer Research*, 49, 3713-3721

Weinberg, R.A. (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 81, 323-330

Whyte, P., Buchkovich, K.J., Horowitz, J.M., Firend, S.H., Raybuck, M., Weinberg, R.A. und Harlow, E. (1988): Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*, 334, 124-129

Williams, M.L., Lennard, M.S., Martin, I.J. und Tucker, G.T. (1994): Interindividual variation in the isomerization of 4-hydroxytamoxifen by liver microsomes: Involvement of cytochrome P450. *Carcinogenesis*, 15, 2733-2738

Willis, S.N. und Adams, J.M. (2005): Life in the balance: How BH3-only proteins induce apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology*, 17, 617-625

Winer, J., Jung, C. K. S., Shackel, I. und Williams, P.M. (1999): Development and Validation of Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase chain Reaction for Monitoring Gene Expression in cardiac Myocytes in *Vitro*. *Analytical Biochemistry*, 270, 41-49

Woods, Y.L., Rena, G., Morrice, N., Barthel, a., Becker, W., Guo, S., Unterman, T.G. und Cohen, P. (2001): The kinase DYRK1a phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site. *Biochem. J.*, 355, 597-607

Wright, W.E. und Shay, J.W. (2001): Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr. Opin. In Genetics & Develop.* 11, 98-103

Wu, C.-L., Zuckerberg, L.R., Ngwu, C., Harlow, E. und Lees, J.A. (1995): In vivo Association of E2F and DP Family Proteins. *Molecular and Cellular Biology* 2536-2546

Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H., Sang, I., chong, G., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, F., field, S. et al. (2001): The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature*, 414, 457-462

Wu, X. und Levine, A.J. (1994): p53 und E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A.* 91, 3602-3606

Xuan, Z. und Zhang, M.Q. (2004): From worm to human: bioinformatics approaches to identify FOXO target genes. *Mechanisms of Ageing and Development*, 126, 209-21

Yamamura, Y., Lee, W.L., Inoue, K., Ida, H. und Ito, Y. (2005): RUNX3 Cooperates with FoxO3a to Induce Apoptosis in Gastric Cancer Cells. *J.Biological Chemistry* Vol.281, No. 8, 5267-5276

Yamasaki, L., Jacks, T., Bronson, R., Goillot, E., harlow, E. und Dyson, N.J.

(1996): Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F- 1. *Cell* 85, 537-548

Yamazaki, K., Yajima, T., Nagao, T., Shinkawa, H., Kondo, F., Hanami, K., Asoh, A., Sugano, I. und Ishida, Y. (2003): Expression of Transcription Factor E2F-1 in Pancreatic Ductal Carcinoma: An Immunohistochemical Study. *Pathology Research AND Practice*, 199, 23-28

Yang, X.-J. und Seto, E. (2007): HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*, 26, 5310-5318

Yao, T.P., Oh, S.P., Zhou, N.D., Ch'ng, L.E., Newsome, D., Bronson, R.T., Li, E., Livingston, D.M. und Eckner, R. (1998): Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell*, 93 (3), 361-372

Zacharatos, P., Kotsinas, A., Evangelou, K., Karakaidos, P., Vassiliou, L.-V., Rezaei, N., Kyroudi, A., Kittas, C., Patsouris, E., Papavassiliou, A.G. und Gorgoulis, V.G. (2004): Distinct expression patterns of the transcription factor E2F-1 in relation to tumour growth parameters in common human carcinomas. *Journal of Pathology*, 203, 744-753

Zhang, W., Patil, S., Chauhan, B., Guo, S., Powell, D.R., Le, J., Klotas, A., Matika, R., Xiao, X., Franks, S., Heidenreich, K.A., Sajan, M.P., Farese, R.V., Stolz, D.B., Tso, P., Koo, S.-H., Montminy, M., und Unterman T.G. (2006): FoxO1 Regulates Multiple Metabolic Pathways in the Liver, Effects on Gluconeogenic, Glycolytic, And Lipogenic Gene Expression. *JBC*, Vol. 281, No. 15, 10105-10117

Zheng W.H., Kar, S. und Quirion R. (2002): FKHL1 and its homologs are new targets of nerve growth factor Trk receptor signaling. *J Neurochem*, 80, 1049-1061

Zhu W., Bijur, GN, Styles, NA und Li, X.: Regulation of FOXO3a by brain-derived neurotrophic factor in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res Mol Brain Res*, 126, 45-56

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J. und Vitzthum, F. (2004): Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implication. *Nucleic Acids Research*, Vol. 32. No. 12 e103

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen

A	Ampere
$\alpha$	anti-
Abb.	Abbildung
AFX	<u>a</u> cute-lymphocyticleukemia-1 <u>f</u> used gene from chromosome <u>X</u>
Ak	Antikörper
Akt	thymoma viral proto-oncogene
Amp	Ampicilinresistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	„b cell lymphoma/leukemia-2“
Bim	<u>B</u> cl-2 <u>i</u> nteracting <u>m</u> ediator of cell death
BMI	Body mass index
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase
bp	Basenpaar
BSA	„bovine serum albumine“, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cA	Cyclin A Bindungsstelle
Ca	Karzinom
CBP	CREB-binding-Protein
CREB	cAMP response element binding protein
Cdk	<u>C</u> yclin – <u>d</u> ependent <u>k</u> inase
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CHX	Cycloheximide
CK1	<u>C</u> asein <u>k</u> inase 1
CKI	cyclin-dependent kinase inhibitor
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
Cre-Rekombinase	causes-recombination
CreER <sup>T2</sup>	Fusionsprotein zwischen Cre-Rekombinase und mutierter

	liganden-Bindungsdomäne des humanen Östrogen-Rezeptors
Ct	threshold cycle
Cyp	Cytochrome P450
d	Tag
D	Dalton
DAF	abnormal <u>DA</u> uer <u>F</u> ormation
DBE	<u>DAF</u> -16 family member- <u>b</u> inding- <u>e</u> lement
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DDB1	damage-specific DNA-binding protein 1
DEPC	Diethylpyrocyrbonat
Dim	Dimerisierungsdomäne
DMEM	<i>Dubecoo´s modification of Eagle´s minimal essential Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´Desoxyribonukleosidtriphosphat
DP	<u>DA</u> NA-binding <u>P</u> rotein
DTT	Dithiothreitol
DYRK1A	dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated Kinase 1A
EB	Elution Buffer
E2F	<u>E2</u> - Promotor Binding <u>F</u> actor
E.coli	Escherichia coli
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	Estrogen Receptor
et al.	et alii
ETOH	Ethanol
FACS	Fluorescence Activted Cell Sorting
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
Fas L	Fas Ligand
FCS	Fetal Calf Serum

FHRE	Forkhead responsive element
FKHR	Forkhead box in rhabdomyosarcoma (= FoxO)
FKHR-L1	Forkhead transcriptionfactor like 1
for	forward-Primer
FoxO	Forkhead box (human), Subgruppe O
G	eng. Gap (Lücke)
g	Gramm
GADD45	growth arrest and DNA-damge inducible superoxid dismutase
G6Pase	Glucose-6-phosphatase
GFP	green fluorescent protein
G418	Neomycinderivat
GTP	Guanosintriphoshat
h	hour (Stunde)
HA	hemagglutinin
HAT	Histonacetylase
HCl	Salzsäure
HDAC	Histondeacetylase
H <sub>2</sub> O	Wasser
HRP	Meerrettichperoxidase (horse raddish peroxidase)
Hsp 90	Hitze-Schock-Protein 90
IGFBP-1	insulin-like growth factor binding protein-1
inkl.	inklusive
i.p.	intraperitoneal
IRS	insulin-responsive sequence
JNK	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase
kb	kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilo-Dalton
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> - Puffer	Kaliumphosphat-Puffer
LB	Luria Broth- Bakteriennährmedium
LBD	Liganden-Bindungs-Domäne
LD-50	dosis letalis 50%
LOH	loss of heterozygosity

luc	Luciferase-Reportergen
M	Mol
M	milli
μ	mikro
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MnSOD	Manganese superoxide dismutase
MoMuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mut	Mutante
<i>MYCN</i>	v-myc myelocytomatosis viral-related oncogene, Neuroblastoma derived (avian)
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NB	Neuroblastom
N-desTAM	N-Desmethyltamoxifen
<i>neo</i>	Neomycin-Gen
NES	nuclear export signal
NGF	nerve growth factor
NLS	nuclear localization signal
NSCLC	non small cell lung cancer
OD	optische Dichte
4-OHT	4-hydroxy-Tamoxifen
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galaktopyranoside
OS	Osteosarkom
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerasekettenreaktion
PEPCK	phosphoenlpyruvate carboxykinase
PKB	protein kinase B (= Akt)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRb	Retinoblastoma Protein
Pten	<u>p</u> hosphatase and <u>t</u> ensin homolog deleted on chromosom <u>ten</u>
p	pico

PI	Propidiumjodid
PI(3,4)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol (3,4)diphosphate
PI(3,4,5)P <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate
PI3K	phosphatidylinositol- <u>3</u> - <u>k</u> inase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
Rb	Retinoblastom
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROS	reactive oxygen species
rpm	rotation per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transcriptase
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
rev	reverse-Primer
s.	siehe
SDS	sodium dodecyl sulfate
SERM	selektiver Estrogen Rezeptor Modulator
SGK	serum-and glucocorticoid-induced kinase
siRNA	small interfering RNA
Sirtuin	silent mating type information regulation
SIRT 1	sirtuin 1
SV40	Simian Virus
TA	Transaktivierungsdomäne
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat/EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	thermostabile DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris- buffered saline
TBS-T	Tris-bufferd saline mit Tween –20
TE	Tris/EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tip60	Tat-interactive protein, 60 kD
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	unit (Einheit)

---

u.U	unter Umständen
UV	ultraviolett
V	Volt
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## 8.2 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

Arnold, Aumüller, Bartsch, Basler, Behr, Berger, Bertalanffy, Bien, Bauer, Baum  
Cetin, Daut, Eckhardt, Eilers, Engehart-Cabillic, Fuchs-Winkelmann, Geus,  
Gotzen, Gress, Griss, Grzeschik, Gudermann, Hadji, Hamer, Happle, Hasilik,  
Hertl, Hofmann, Hoyer, Kann, Kern, Klenk, Klose, Koolmann, Krause,  
Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhn, Lang, Lill, Löffler, Lohoff, Maier, Maisch,  
Mennell, Moll, Moosdorf, Müller, R., Müller, U., Mutters, Neubauer, Oertel,  
Pagenstecher, Renschmidt, Renz, Richter, Röhm, Roeper, Rothmund,  
Ruchholtz, Schäfer, Schmidt, Schüffel, Seitz, Seyberth, Sommer, Steininger,  
Sundermeyer, Sure, Suske, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner und Wulf in  
Marburg und Roelke, Schneider und Weiler in Gießen, sowie Grond in Siegen

### 8.3 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich ganz herzlich bei PD Dr. Werner Lutz für die engagierte Betreuung während der Zeit im Labor und auch beim Schreiben der Arbeit und für die Bereitstellung der beiden sehr interessanten Projekte, an denen ich mitarbeiten durfte.

Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. Martin Eilers für Bereitstellung des Laborplatzes und die freundliche Aufnahme in die Laborgemeinschaft sowie für seine hilfreichen Ratschläge und Diskussionen herzlich bedanken.

Für die Hilfe bei den FACS-Analysen möchte ich mich bei Nicole Forster und Sven Gallinat bedanken.

Für die Hilfe beim tierexperimentellen Teil der Arbeit danke ich besonders Antje Grzeschiczek, die sich hervorragend um die Mauszucht und die Genotypisierung der Mäuse gekümmert hat.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Katrin Nowak bedanken, die mich geduldig bei den ersten Schritten in der Zellkultur begleitet hat.

Ein Dankeschön möchte ich allen Mitgliedern der AG Lutz und AG Eilers für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen großen und kleinen Problemen sagen.

Ein großer Dank geht auch an meine Eltern, die mich während des gesamten Studiums begleitet haben und stets ein offenes Ohr für meine Probleme haben.

#### 8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

*„Regulation der FOXO-Gene durch E2F-1 und die induzierbare systemische Rekombination eines konditionellen Allels in der Maus“*

im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. Martin Eilers mit Unterstützung durch PD Dr. Werner Lutz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen

K. Nowak, K. Kerl, D. Fehr, C. Geßner, K. Killmer, B. Samans, B. Berwanger, H. Christiansen und W. Lutz (2006): *BMI 1* is a target gene of E2F-1 and is strongly expressed in primary neuroblastomas. *Nucleic Acids Research*, Vol.34, no.6, 1745-1754

K. Nowak, K. Killmer, C. Geßner und W. Lutz (2007): E2F-1 regulates expression of *FOXO1* and *FOXO3a*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1769 (4), 244-252

veröffentlicht.

Marburg, den 04. Juni 2009