# Charakterisierung der Rolle von ETO und AML1/ETO als SHARP interagierende Proteine bei der RBP-Jκ/SHARP vermittelten Transkriptionskontrolle von Notch-Zielgenen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat. der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm vorgelegt von

Daniela Salat

aus Aalen

Die vorliegende Promotion wurde in der Abteilung Innere Medizin I (Zentrum für Innere Medizin) des Uniklinikums Ulm angefertigt.

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler
1. Gutachter:	Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler
2. Gutachter:	

Tag der Promotion:

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Der Notch-Signaltransduktionsweg	1
1.1.1 Die Entdeckung von Notch	1
1.1.2 Notch-Rezeptoren und -Liganden	1
1.1.3 Der Ablauf der Notch-Signaltransduktion	4
1.1.4 Notch-Zielgene	6
1.1.5 Funktionen des Notch-Signaltransduktionswegs	7
1.1.6 Der Notch-Signaltransduktionsweg und Krankheiten	9
1.2 RBP-Jк ("Recombination signal binding Protein- J $\kappa$ ")	10
1.3 Transkriptionskontrolle von Notch-Zielgenen	10
1.4 SHARP ("SMRT/HDAC associated Repressor Protein")	11
1.5 ETO (" <i>Eight-Twenty-One</i> ")	12
1.6 AML1/ETO	14
1.7 Zielsetzung	16
2. Material	17-26
2.1 Zelllinien	17
2.2 Zellkulturmedien	17
2.3 Bakterienstämme	18
2.4 Bakterienmedien	18
2.5 Verwendete Puffer und Lösungen	18
2.5.1 Allgemeine Puffer	18
2.5.2 SDS-PAGE	19
2.5.3 Coomassie-Brillantblau-Färbung	19
2.5.4 Western-Blot	19
2.5.5 GST-Pull-Down	19
2.5.6 EMSA	19
2.5.7 Zelllysepuffer	20
2.6 Antikörper	20
2.6.1 Primärantikörper	20

I

1-16

- 2.6.2 Sekundärantikörper 21
- 2.7 Vektoren

2.8 Enzyme	21
2.9 Oligonukleotide	22
2.9.1 Standard-PCR	22
2.9.2 Quantitative Real-Time-PCR	22
2.9.3 Klonierung von AML1/ETO(tr)	23
2.10 Reaktionssysteme	23
2.11 Chemikalien	24
2.12 Verbrauchsmaterialien	25
2.13 Geräte	25

## 3. Methoden

27-45

3.1 Zellbiologische Methoden	27
3.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien	27
3.1.2 Lagerung und Reaktivierung von Stammkulturen	27
3.1.3 Transiente Transfektion mit CaCl <sub>2</sub> /Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	28
3.1.4 Transiente Transfektion mit Nanofectin	29
3.2 Molekularbiologische Methoden	29
3.2.1 Kultivierung und Lagerung von E. coli Bakterien	29
3.2.2 Transformation chemisch kompetenter E. coli Bakterien	29
3.2.3 Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli	30
3.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA	31
3.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen	31
3.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31
3.2.7 Annealing von Oligonukleotiden zu doppelsträngiger DNA	33
3.2.8 Herstellung von DNA-Fragmenten mit Restriktionsenzymen	33
3.2.9 Herstellung von glatten 5'-Enden mittels Klenow-Polymerase	34
3.2.10 Dephosphorylierung von Vektor-DNA	34
3.2.11 Elektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen	34
3.2.12 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren	35
3.2.13 Sequenzierung	35
3.3 Proteinbiochemische Methoden	35
3.3.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Zellkulturen	35
3.3.2 Herstellung von Proteinlysaten mit Laemmli-Puffer	35
3.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten	36
3.3.4 Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE	36
3.3.5 Anfärbung von Proteinen in Acrylamid-Gelen	37
3.3.6 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western-Blot)	37
3.3.7 Immunfärbung von membrangebundenen Proteinen	38
3.3.8 Immunpräzipitation (IP)	38
3.3.9 Immunfluoreszenzfärbung (IF)	39

3.3.10 In vitro Transkription/Translation von Proteinen	40
3.3.11 Herstellung von GST-Fusionproteinen	40
3.3.12 GST-Pull-Down	41
3.3.13 Aufreinigung von DNA-bindenden RBP-J $\kappa$ -Komplexen	42
3.3.14 Gelretardation (EMSA)	44
3.3.15 Luciferase-Assay	44

## 4. Ergebnisse

### 46-80

4.1 Identifizierung von ETO und AML1/ETO als neue Interaktionspartner der
Repressionsdomäne von SHARP 46
4.1.1 ETO und AML1/ETO interagieren mit der Repressionsdomäne (RD) von SHARP
<i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> 47
4.1.2 Die endogenen ETO und AML1/ETO Proteine interagieren mit SHARP in HEL-
und Kasumi-Zellen 49
4.1.3 Die Interaktion von ETO mit SHARP-RD erfolgt über die ersten beiden
funktionellen Domänen (NHR1 und 2) von ETO 51
4.2 Herstellung und intrazelluläre Lokalisation von eGFP-Fusionsproteinen von ETO,
AML1/ETO und AML1/ETO(tr) 53
4.3 Identifizierung endogener ETO- bzw. AML1/ETO-RBP-Jk-Proteinkomplexe 55
4.3.1 Endogenes RBP-Jκ kopräzipitiert mit ETO 56
4.3.2 Endogenes ETO kopräzipitiert mit SHARP und RBP-J $\kappa$ an den
Promotorregionen der Notch-Zielgene HES1 und Nrarp 57
4.3.3 AML1/ETO ist Bestandteil endogener RBP-J $\kappa$ -Komplexe in Kasumi-Zellen 57
4.4 Charakterisierung der Interaktion von ETO bzw. AML1/ETO mit RBP-J $\kappa$ 59
4.4.1 ETO und AML1/ETO interagieren nicht direkt mit RBP-J $\kappa$ 60
4.4.2 ETO bzw. AML1/ETO kolokalisieren mit SHARP und RBP-J $\kappa$ im Zellkern 61
4.5 Funktionelle Charakterisierung von ETO und AML1/ETO als SHARP interagierende
Proteine 63
4.5.1 Im Gegensatz zu AML1/ETO agiert ETO als HDAC-abhängiger Korepressor zu
SHARP 63
4.5.2 Im Gegensatz zu AML1/ETO hemmt ETO die Promotoraktivität der Notch-
Zielgene HES1 und Hey1 66
4.5.3 ETO und AML1/ETO haben keinen Einfluss auf eine Notch-IC vermittelte
Transkription 68
4.6 Überexpression von AML1/ETO und AML1/ETO(tr) führt zu einer transkriptionellen
Aktivierung der Notch-Zielgene <i>Hey</i> 2 und <i>p</i> 21 <sup>WAF1</sup> 69
4.7 Ein spezifischer Knock-Down von AML1/ETO in Kasumi-Zellen führt zu einer
transkriptionellen Herabregulation von Notch-Zielgenen 70
4.8 AML1/ETO reguliert die Expression von Notch-Zielgenen direkt 71

4.9 Analyse weiterer Vertreter der ETO-Familie: Murines ETO-2 und Xenopus	Laevis
ETO (xl) und XETOR	73
4.9.1 Murines ETO-2	74
4.9.1.1 ETO-2 interagiert mit SHARP-RD in vitro und in vivo	74
4.9.1.2 ETO-2 interagiert nicht mit RBP-J $\kappa$	76
4.9.1.3 ETO-2 ist ein HDAC-abhängiger Korepressor zu SHARP	77
4.9.2 X. laevis ETO (xl) und XETOR	79
4.9.2.1 Im Gegensatz zu XETOR interagiert X. laevis ETO (xI) mit SHARP-RD	79
4.9.2.2 X. laevis ETO (xl) agiert als Korepressor zu SHARP	79
5. Diskussion	81-91
5.1 Identifizierung von ETO und AML1/ETO als neue Komponenten von RBP-Jκ/S Komplexen	HARP- 81
5.2 ETO fungiert als Korepressor zu SHARP	83
5.3 Mechanismus der von AML1/ETO gestörten Hemmung von Notch-Zielgenen	85
5.4 Die Rolle des Notch-Signaltransduktionswegs bei der Entstehung von Le	ukämie
	89
5.5 Die Rolle der ETO-Familie im Notch-Signaltransduktionsweg	90
6. Zusammenfassung	92
7. Literaturverzeichnis	95

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl) dimethyl-ammonio]-1-propan-sulfonat
Ci	Curie
CIP	alkalische Phosphatase
DAPT	N-[N-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-butyl Ester
DEAF	"deformed epidermal autoregulatory factor 1"
D-MEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum
FP	fluoreszierendes Protein
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
lgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
I	Liter
LB	Luri-Bertani
Μ	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute

ml	Milliliter
mМ	Millimol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
nM	Nanomol
NP-40	Nonidet P40
OD	Optische Dichte
р	pico
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PVDF	Polyvinyldifluorid
RNase	Ribonuklease
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TSA	Trichostatin A
TWEEN	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Units
UV	Ultraviolettes Licht
μg	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter

### 1. Einleitung

Über eine nur geringe Anzahl an Signaltransduktionswegen werden zelluläre Prozesse wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose während der Entwicklung eines Organismus kontrolliert. Zu diesen Signalwegen gehören unter anderem der Wnt-Signalweg, der Hedgehog-Signalweg und der Notch-Signaltransduktionsweg (52). Bei dem Notch-Signaltransduktionsweg handelt es sich um eine hoch konservierte Art der Zellkommunikation, die von Nematoden bis zum Menschen bei Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen eine wichtige Rolle spielt (5).

#### 1.1 Der Notch-Signaltransduktionsweg

#### 1.1.1 Die Entdeckung von Notch

Die erste Notch-Mutante wurde 1914 von Dexter bei *Drosophila melanogaster* entdeckt (39). Es folgten weitere Notch-Mutanten, die von Morgan und Bridges 1916 entdeckt wurden. 1919 wurde der Phänotyp von Notch, der sich durch Kerben (*"notches"*) am Flügelrand auszeichnete, durch Mohr genauer beschrieben (115). Da stets nur weibliche Fruchtfliegen diesen Phänotyp aufwiesen, wurde er mit einem Defekt auf dem X-Chromosom in Verbindung gebracht (115). Weitere Untersuchungen bezüglich Mutationen des X-Chromosoms und deren Einfluss auf die Entwicklung von *D. melanogaster* zeigten, dass Notch unerlässlich für eine normale Entwicklung ist (139).

#### 1.1.2 Notch-Rezeptoren und -Liganden

Notch-Rezeptoren und Liganden sind Typ I Transmembranproteine. Der strukturelle Aufbau aller Rezeptoren und Liganden ist konserviert. Die Notch-Rezeptorfamilie umfasst ein Mitglied in *D. melanogaster* (77), zwei in Nematoden (56) und vier Vertreter in Säugern (15) (Tab. 1.1.). Die Liganden werden zur DSL-Familie (<u>D</u>elta-<u>S</u>errate-<u>L</u>ag-2) zusammengefasst. In *D. melanogaster* wurden Delta und Serrate als Notch-Liganden identifiziert (40). Säuger exprimieren drei Homologe zu dDelta

(Delta-like 1, 3 und 4) und zwei Homologe zu dSerrate (Jagged-1 und 2) (140). In Nematoden existieren vier DSL-Liganden: Lag-2, Apx-1, Arg-1 und Dsl-1 (Tab. 1.1) (39, 56).

	Säuger	D. melanogaster	C. elegans
Rezeptor	Notch-1-4	Notch	Lin-12
			Glp-1
Ligand	Delta-like 1 (Dll 1)	Delta	Lag-2
	Delta-like 2 (Dll 3)	Serrate	Apx-1
	Delta-like 3 (Dll 4)		Arg-1
	Jagged-1		Dsl-1
	Jagged-2		

Tab. 1.1: Übersicht über die bekannten Notch-Rezeptoren und -Liganden in Säugern, *D. melanogaster* und *C. elegans* 

In ihrem strukturellen Aufbau unterscheiden sich DSL-Liganden in der Anzahl der EGF-Wiederholungen ("*epidermal growth factor"*) in der extrazellulären Domäne. Am N-Terminus enthalten alle Liganden eine DSL-Domäne. Zusätzlich enthalten Serrate/Jagged-Liganden eine <u>cysteinreiche Domäne</u> (CR) (40, 140). Abbildung 1.1 zeigt den Aufbau der Notch-Liganden am Beispiel von humanem Jagged-1 und Delta-like 1.



**Abb. 1.1: Proteinaufbau der Notch-Liganden Jagged-1 und Delta-like 1.** Humanes Jagged-1 und Delta-like 1 enthalten in ihrer extrazellulären Domäne jeweils eine DSL-Domäne gefolgt von einer variablen Anzahl an EGF-Wiederholungen. Zusätzlich besitzen Jagged-Liganden eine cysteinreiche Domäne C-terminal zu den EGF-Wiederholungen. CR: cysteinreiche Domäne; DSL: Delta-Serrate-Lag-2; EGF: *"epidermal growth factor"*-Wiederholungen; ZM: Zellmembran.

Bei den Notch-Rezeptoren handelt es sich um Heterodimere. Abbildung 1.2 zeigt den schematischen Aufbau eines Notch-Rezeptors am Beispiel von murinem Notch-1.

Die extrazelluläre Domäne beinhaltet 36 EGF-Wiederholungen und drei cysteinreiche, Ca<sup>2+</sup>-bindende Notch/Lin-12-Wiederholungen (15, 141). Die EGF-Wiederholungen sind für die Ligandenbindung verantwortlich (154). Die intrazelluläre Domäne besitzt sechs Tandem-Ankyrin-Wiederholungen, die auch als CDC10-Domäne bezeichnet werden (87). Des Weiteren konnte eine glutaminreiche OPA-Domäne, eine prolin-, glutamin-, serin- und threoninreiche PEST-Region und eine RAM23-Domäne identifiziert werden (140, 162, 177). Die RAM23-Domäne beinhaltet ein <u>nukleäres Lokalisationssignal</u> (NLS) und ist neben den Ankyrin-Wiederholungen für die Interaktion mit RBP-Jk verantwortlich (68, 162). Die Region zwischen den Ankyrin-Wiederholungen und der PEST-Region wurde als Transaktivierungsdomäne (TAD) identifiziert (87). Neben dem NLS innerhalb der RAM23-Domäne konnte bis jetzt noch ein weiteres NLS entdeckt werden (68, 82).

Notch-Rezeptoren werden als 300-350 kDa große Vorläuferproteine synthetisiert. Im Trans-Golgi-Apparat durchlaufen sie eine proteolytische Prozessierung, an der eine Furin-Konvertase beteiligt ist (S1-Spaltung) (99). Es ist allerdings unklar, ob dieser Proteolyseschritt auch in D. melanogaster vorkommt oder ob er tatsächlich für den Reifungsprozess von Notch-Rezeptoren benötigt wird (120). Die Rezeptoren werden anschließend als Heterodimere, die über eine Ca<sup>2+</sup>-Brücke miteinander verbunden sind, an der Zellmembran präsentiert (11, 141). Nach der Ligandenbindung folgen weitere enzymatische Spaltungsprozesse (S2- und S3-Spaltung; Abb.1.2; siehe 1.1.3). Die Spezifität von Notch-Rezeptoren zu einem Ligandentyp kann durch Glykosylierungen der EGF-Wiederholungen verändert werden. Glykosyl-Transferasen der Fringe-Familie fördern die Interaktion zwischen Notch-Rezeptoren und Delta-Liganden, während die Interaktion mit Liganden des Serrate/Jagged-Typs inhibiert wird (116, 154, 188).



Abb. 1.2: Proteinaufbau und Prozessierung des murinen Notch-1-Rezeptors. mNotch-1 wird mit Hilfe einer Furin-Konvertase im Trans-Golgi-Apparat zwischen der N/L-Domäne und der RAM23-Domäne gespalten (S1). Anschließend wird der Rezeptor als Heterodimer bestehend aus einer extrazellulären, einer Transmembran- und einer intrazellulären Domäne an der Zellmembran präsentiert. Die Ligandenbindung löst weitere proteolytische Spaltungsprozesse aus. Durch Kuzbanian/TACE-Metalloproteasen wird die extrazelluläre Domäne abgespalten (S2), was in N $\Delta$ E bestehend aus der Transmembran- und der intrazellulären Domäne resultiert. Anschließend wird durch eine  $\gamma$ -Sekretase die intrazelluläre Domäne freigesetzt (S3). Die Sterne zeigen die Proteolysestellen an. ANK: Ankyrin-Domäne; EC: extrazelluläre Domäne; EGF: *"epidermal growth factor"*-Wiederholungen; IC: intrazelluläre Domäne; N $\Delta$ E: Notch $\Delta$ E; N/L: Notch/Lin-12-Domäne; PEST: prolin-, glutamin-, serin-, threoninreiche Domäne; RAM: RAM23-Domäne; TM: Transmembrandomäne.

#### 1.1.3 Der Ablauf der Notch-Signaltransduktion

Der Notch-Signaltransduktionsweg weist zwei Besonderheiten auf. Da es sich sowohl bei den Rezeptoren als auch den Liganden um membranständige Proteine handelt, ist zum einen die Kommunikation auf benachbarte Zellen begrenzt. Zum anderen findet die Signaltransduktion ohne eine Signalamplifikation statt. Notch-Rezeptoren agieren gleichzeitig über CSL-Proteine (1.2) auch als Aktivatoren der Transkription. Eine solche Signalweiterleitung über bifunktionale Proteine wird als regulierte intramembrane Proteolyse (RIP) bezeichnet. RIP zeichnet sich durch folgende Merkmale aus. Die Proteolyse ist irreversibel. Es kommt dadurch nur zu einer einmaligen Signalweiterleitung. Die Verstärkung des Signals ist limitiert.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass die Abspaltungsprodukte eigene Signalfunktionen besitzen (154).

Im Fall des Notch-Signaltransduktionswegs (Abb. 1.3) löst die Bindung eines Liganden an einen Notch-Rezeptor einen zweistufigen Abspaltungsprozess der intrazellulären Domäne aus. Im ersten Schritt (S2-Spaltung, Abb. 1.2) wird über Metalloproteasen die extrazelluläre Domäne des Rezeptors abgespalten. Es handelt sich hierbei um Proteasen der ADAM-Familie, ADAM10 (Kuzbanian) und ADAM17 (<u>"TNFa converting enzyme</u>", TACE) (17, 145). Das entstehende Zwischenprodukt wird als Notch ohne extrazelluläre Domäne, Notch∆E, bezeichnet. Die Generierung von Notch∆E ist die Vorraussetzung für den zweiten Proteolyseschritt (S3-Spaltung, Abb. 1.2), der die Abspaltung der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors (Notch-IC) zur Folge hat. Dieser Schritt findet innerhalb der Transmembrandomäne statt und wird durch den  $\gamma$ -Sekretase-Proteinkomplex katalysiert (27, 41, 83, 151). Dieser Proteinkomplex enthält Presenilin, Nicastrin, APH1 und Pen2 (41). Die Notch-IC bildet die konstitutiv aktive Form des Rezeptors und wandert in den Zellkern (152, 160). Dort fördert sie durch Bindung an Proteine der CSL-Familie (CBF1 (RBP-J $\kappa$ ), Su(H), Lag-1 (1.2)) die Aktivierung der Transkription von Notch-Zielgenen (1.1.4), indem der zuvor gebundene Repressorkomplex (1.3) verdrängt und durch einen Aktivatorkomplex (1.3) ersetzt wird (14, 68). Die Terminierung des Notch-Signals erfolgt durch eine Phosphorylierung von Notch-IC an der PEST-Domäne durch die Kinase CDK8 in Verbindung mit Zyklin C (15, 46). Phosphoryliertes Notch-IC bildet ein Substrat für E3-Ubiquitinligasen wie SEL-10 (182). Die Ubiquitinylierung hat den Abbau von Notch-IC zur Folge.



**Abb. 1.3: Überblick über den Notch-Signaltransduktionsweg.** In Abwesenheit der Notch-IC hemmen Proteine der CSL-Familie in Verbindung mit weiteren Korepressoren die Transkription von Notch-Zielgenen. In Folge einer Ligandenbindung kommt es durch einen zweistufigen Abspaltungsprozess (S2 und S3) zur Freisetzung von Notch-IC. Notch-IC wandert anschließend in den Zellkern. Durch die Bindung von Notch-IC an CSL-Proteine wird der Repressorkomplex verdrängt und über die Rekrutierung weiterer Koaktivatoren die Transkription von Notch-Zielgenen aktiviert. CSL: CBF1/Su(H)/Lag-1; EC: extrazelluläre Domäne; IC: intrazelluläre Domäne; KoAs: Koaktivatoren; KoRs: Korepressoren; N: Nukleus; ZM: Zellmembran; ZP: Zytoplasma.

#### 1.1.4 Notch-Zielgene

Der Notch-IC/RBP-Jκ-Komplex reguliert in *D. melanogaster* Gene der <u>"enhancer of split</u>"-Familie (E(spl)) und in Säugern Gene der <u>"hairy enhancer of split</u>"-Familie (HES) (6, 71).

Die *E(spl)/HES*-Genfamilie kodiert für hemmende Transkriptionsfaktoren, die zum Typ der "*basic-Helix-Loop-Helix*"-Proteine (bHLH) gehören. bHLH-Proteine binden in Form von Homo- oder Heterodimeren an spezifische DNA-Erkennungssequenzen. Für die DNA-Bindung ist die *"basic"-Domäne, für die Dimerisierungen die HLH-Domäne verantwortlich. In Abhängigkeit ihrer strukturellen und biochemischen Merkmale werden bHLH-Proteine in drei verschiedene Klassen eingeteilt. Die* 

E(spl)/HES-Familie werden zur Klasse C der bHLH-Transkriptionsfaktoren gezählt (71, 121). Von den sieben bekannten Mitgliedern der HES-Familie sind nur *HES1* und *HES5* Notch-Zielgene (74, 128). Innerhalb von Unterfamilien der HES-Familie konnten *Hey1*, *Hey2*, *HERP1* und *HERP2* ebenfalls als Notch-Zielgene identifiziert werden (71, 72, 104). Des Weiteren konnten Notch-Zielgene entdeckt werden, die nicht für bHLH-Proteinfamilie codieren. Hierzu zählen z.B. *Nrarp*, *p21<sup>WAF1</sup>* und *c-Myc* (89, 142, 175).

### 1.1.5 Funktionen des Notch-Signaltransduktionswegs

In *D. melanogaster* spielt der Notch-Signaltransduktionsweg während der gesamten Larvalentwicklung eine wichtige Rolle. Er ist beginnend bei der Oogenese an der Entwicklung fast aller Organe beteiligt (16, 36, 43, 61, 63, 135, 185).

Über *"loss-of-function"-*Mutanten in *D. melanogaster* wurde *Notch* als ein neurogenes Gen identifiziert (120). Ein Verlust der Notch-Funktion führt zu einer vermehrten Expression von proneuralen Genen und somit zu einer verstärkten Ausbildung von Neuronen. Ein konstitutiv aktives Notch (*"gain-of-function"*) erzeugt den gegenteiligen Phänotyp.

Auch in Vertebraten ist der Signalweg in fast allen Entwicklungsschritten involviert (140). Hier ist insbesondere seine Rolle während der Neurogenese, der Hämatopoese und der Myogenese gut untersucht (9, 127, 170).

Die Wirkungsmechanismen des Notch-Signaltransduktionswegs lassen sich in drei Kategorien einteilen: Laterale Inhibition, Grenzbildung und asymmetrische Zellteilung.

Die **laterale Inhibition** (Abb. 1.4 A) ist die am besten charakterisierte Funktionsweise des Notch-Signaltransduktionswegs. Dieses Modell erklärt die Entstehung von zwei unterschiedlichen Zelltypen aus einer Ansammlung equipotenter Vorläuferzellen. Ein gut untersuchtes Beispiel der lateralen Inhibition bildet die Entwicklung von Chemo-/Mechanorezeptoren (Chaetae) in *D. melanogaster*. Aus einer Ansammlung gleicher Zellen beginnt eine Zelle eine höhere Konzentration an Notch-Liganden zu exprimieren (Senderzelle). In den umliegenden Zellen (Empfängerzellen) wird in Folge eine weitere Bildung von Liganden unterdrückt und die Expression von Notch-Rezeptoren hochreguliert. Durch Ligand/Rezeptor-Interaktionen und die daraus resultierende Aktivierung des Notch-

Signaltransduktionswegs in den umliegenden Zellen werden diese gezwungen, sich zu einem anderen nicht neuronalen Zelltyp als die Senderzelle zu differenzieren. Die Ausbildung der Senderzelle ist abhängig von deren Lage innerhalb des Zellhaufens (13). Auch bei der Neurogenese von Vertebraten spielt der Mechanismus der lateralen Inhibition eine wichtige Rolle (9, 94).



Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Funktionsmechanismen des Notch-Signaltransduktionswegs. (A) Der Mechanismus der lateralen Inhibition stellt während der Neurogenese sicher, dass sich aus einer Ansammlung equipotenter Zellen (grau) nur eine Zelle (grün) zu einer neuronalen Vorläuferzelle differenziert, während die umliegenden Zellen (rot) daran gehindert werden, sich ebenfalls zu Neuronen zu differenzieren. (B) Durch den Mechanismus der Grenzbildung zwischen zwei Gewebetypen werden zwei Gruppen an Zelltypen (grün und rot) durch gegenseitige Aktivierung des Notch-Signaltransduktionswegs über verschiedene Liganden voneinander getrennt. (C) Bei der asymmetrischen Zellteilung kommt es durch eine ungleiche Verteilung des negativen Notch-Regulators Numb (schwarze Umrahmung) zur Ausbildung zweier unterschiedlicher Tochterzellen (grün und rot) aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle (grau). Dabei ist der Notch-Signaltransduktionsweg nur in der Zelle (rot) aktiv, die kein Numb exprimiert. Die schwarzen Pfeile geben die Richtung des Notch-Signals an.

Bei der **Grenzbildung zwischen Gewebetypen** (Abb. 1.4 B) exprimieren die Zellen mit einem Überschuss an Notch-Rezeptoren, im Gegensatz zur lateralen Inhibition, auch weiterhin durch eine positive Rückkoppelung Liganden. Dadurch wird gewährleistet, dass die Zellen an der Grenzfläche unterschiedlich bleiben. Ein Beispiel für dieses Funktionsmodell ist die Bildung der dorsoventralen Grenze bei der Flügelentwicklung in *D. melanogaster*. Die Glykosyl-Transferase Fringe spielt bei der Herstellung der Asymmetrie zwischen den Zellpopulationen eine entscheidende Rolle. In Zellen der dorsalen Seite wird Fringe und der Notch-Ligand Serrate exprimiert. Dadurch werden in den dorsalen Zellen die Notch-Rezeptoren so

modifiziert, dass diese nur noch an den Liganden Delta der ventralen Seite binden können. Die Notch-Rezeptoren der ventralen Seite binden dagegen immer noch an Serrate (13, 183).

Bei der **asymmetrischen Zellteilung** (Abb. 1.4 C) wird die Notch-Aktivität unter anderem durch Numb, dem *D. melanogaster* Homolog zu Numb und Numblike in Vertebraten, reguliert. Numb inhibiert Notch. So kommt es nach der Zellteilung in derjenigen Tochterzelle, in der Numb exprimiert wird, zu keiner Weiterleitung des Notch-Signals, auch wenn umliegende Zellen Notch-Liganden präsentieren. Dieser Mechanismus kommt in *D. melanogaster* neben der lateralen Inhibition bei der Ausdifferenzierung der vier Zelltypen (Schaft-, Sockel-, Gliazelle und Neuron), aus denen die Chaetae sich zusammensetzen, zum Einsatz (13, 22).

### 1.1.6 Der Notch-Signaltransduktionsweg und Krankheiten

Treten Fehler in der Notch-Signaltransduktion auf, z.B. durch Mutationen einzelner Komponenten, kann dies zu schwerwiegenden Krankheiten führen. Dabei kann es zur Bildung von Tumoren oder Fehlfunktionen von einem oder mehreren Organen kommen.

Das bekannteste Beispiel einer malignen Erkrankung durch eine Fehlfunktion von Notch ist die humane akute lymphatische Leukämie von T-Zellen (T-ALL) (147). Veränderungen des Notch-1-Rezeptors sind hier maßgeblich an der Entstehung dieser Leukämie beteiligt. In ca. 1 % der Fälle ist die chromosomale Translokation t(7;9) des *Notch-1*-Gens involviert. Diese Translokation führt zu einer Variante von Notch-1, die auch als TAN-1 bekannt ist (31). Interessanterweise findet man in 55-60 % aller Fälle von T-ALL aktivierende Notch-Mutationen (147).

Mutationen innerhalb der extrazellulären EGF-Wiederholungen von Notch-3 verursachen das CADASIL-Syndrom ("*cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*") (57). Es handelt sich hierbei um eine degenerative Funktionsstörung im zentralen Nervensystem, die in erster Linie mit krankhaften Veränderungen kleiner Arterien im Gehirn verbunden ist.

Ein weiteres Beispiel ist das Alagille-Syndrom, eine Krankheit, die durch Mutationen von Jagged-1 verursacht wird (57). Das Alagille-Syndrom ist eine dominant autosomale Erkrankung und äußert sich in Fehlbildungen von Leber, Herz, Augen und Skelett.

#### 1.2 RBP-Jκ ("<u>*R*</u>ecombination signal <u>b</u>inding <u>P</u>rotein-Jκ")

RBP-J $\kappa$ , auch als CBF1 oder KBF2 bezeichnet (18, 174), wird in Vertebraten exprimiert und zur Familie der CSL-Proteine gezählt. Dabei steht CSL für <u>C</u>BF1, "<u>Suppressor of Hairless</u>" (Su(H)) und <u>L</u>ag-1. Su(H) ist das *D. melanogaster* Homolog zu RBP-J $\kappa$  (48). Lag-1 ist der Vertreter der CSL-Familie in Nematoden (24).

RBP-J $\kappa$  wurde erstmals als 60 kDa großes DNA-bindendes Protein aus murinen B-Vorläuferzellen isoliert (59). Struktur- und Sequenzanalysen zeigten, dass es sich bei RBP-J $\kappa$  um ein hoch konserviertes Protein handelt. *D. melanogaster* Su(H) und murines RBP-J $\kappa$  sind zu 75 % homolog zueinander (48). Die zentralen 248 Aminosäuren, die auch ein aus 40 Aminosäuren bestehendes Integrase-Motiv beinhalten, zeigen eine 93 %ige Homologie (48, 106). In Analysen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen RBP-J $\kappa$  wurde gezeigt, dass RBP-J $\kappa$  in allen untersuchten Gewebetypen und Zelllinien exprimiert wird (60). Des Weiteren wurde RBP-J $\kappa$  als ein nukleäres Protein identifiziert (60, 149). Weitere Studien identifizierten die genaue DNA-Bindesequenz von RBP-J $\kappa$ . Dabei handelt es sich um ein Oktamer mit der Sequenz 5'-CGTGGGAA-3' (168).

Untersuchungen mit dem Adenovirus Kapsidprotein Polypeptid pXI und einer Spleißvariante von RBP-J $\kappa$ , RBP-2N, gaben erste Hinweise darauf, dass es sich bei RBP-J $\kappa$  um einen transkriptionellen Regulator handelt (29). Weitere Arbeiten zeigten, dass RBP-J $\kappa$  neurogene Eigenschaften besitzt (49).

Eine erste Verbindung zwischen Notch und der CSL-Familie wurde in *D. melanogaster* festgestellt (42). Später fand man heraus, dass RBP-J $\kappa$  ein direktes Ziel von Notch ist. Notch, das selbst nicht an die DNA binden kann, benutzt das an die DNA gebunden vorliegende RBP-J $\kappa$  als Vermittler zur Aktivierung der Transkription (66, 92). Am murinen Notch-1-Rezeptor wurde gezeigt, dass die RAM23-Domäne und die Ankyrin-Domäne für die Interaktion der intrazellulären Domäne mit RBP-J $\kappa$  verantwortlich ist (87, 162).

#### 1.3 Transkriptionskontrolle von Notch-Zielgenen

RBP-J $\kappa$  nimmt eine Sonderstellung im Notch-Signaltransduktionsweg ein. Als ständig an die DNA gebunden vorliegender Transkriptionsfaktor kontrolliert es unmittelbar die Transkription von Notch-Zielgenen. In Abwesenheit von Notch-IC reprimiert es deren Transkription. Kommt es zur Interaktion mit der intrazellulären Domäne eines Notch-Rezeptors, so schaltet RBP-J $\kappa$  vom transkriptionellen Repressor zum Aktivator um (47). Um die Transkription von Notch-Zielgenen zu kontrollieren, rekrutiert RBP-Jk zusätzliche Kofaktoren. Für die RBP-Jk vermittelte Repression gibt es zwei Modellvorstellungen. Im ersten Modell wird angenommen, dass RBP-J $\kappa$  mit den Transkriptionsfaktoren TFIIA und TAFII110, einer Untereinheit von TFIID, interagiert. Durch die daraus resultierende Destabilisierung der TFIIA/TFIID Interaktion kommt es zu einer Transkriptionshemmung (131). Im zweiten favorisierten Modell wird davon ausgegangen, dass RBP-Jκ Histondeacetylase (HDAC)-abhängige Repressorkomplexe rekrutiert. Es wurden bereits mehrere solcher Komplexe identifiziert: ein SMRT bzw. NcoR/Sin3A/HDAC1-Komplex, ein CIR/HDAC2/SAP30-Komplex und ein KyoT2-Komplex (69, 75, 164). Später wurde ein weiterer HDACabhängiger Komplex aus SHARP, CtIP und CtBP an RBP-J $\kappa$  identifiziert (132, 134). interagierende Protein SKIP konnte ebenfalls Ski als Teil eines Das Repressorkomplexes identifiziert werden. SKIP interagiert mit RBP-J<sub>K</sub>, SMRT, CIR und SHARP (132, 192-194). SKIP ist ebenfalls in der Lage, an Notch-IC zu binden (193). Da aber eine Bindung von Aktivatoren an RBP-Jk eine gleichzeitige Bindung von Repressoren ausschließt, wird davon ausgegangen, dass SKIP durch die Bildung eines intermediären Komplexes den Übergang von Repressor- zu Aktivatorkomplex erleichtert (120). Ob SKIP auch Teil eines Aktivatorkomplexes ist, ist nicht bekannt.

Die Bindung von Notch-IC verdrängt Repressorproteine von RBP-J $\kappa$  (68). Zusammen mit RBP-J $\kappa$  und hMAML, einem Homolog zu *D. melanogaster* Mastermind, bildet Notch-IC einen ternären Komplex (184). Dieser Komplex rekrutiert wiederum Koaktivatoren wie p300, CBP, P/CAF und GCN5, die eine intrinsische <u>Histonacetyltransferase</u> (HAT)-aktivität besitzen (86, 126, 133). Durch die Acetylierung von Histonen wird die Chromatinstruktur entspannt, wodurch eine Transkription ermöglicht wird (161).

### 1.4 SHARP (<u>"SMRT/HDAC associated Repressor Protein"</u>)

In einem Yeast-Two-Hybrid-Experiment wurde SHARP zuerst als Kofaktor zu SMRT identifiziert (155). SHARP gehört zur Familie der "*Split ends*" (Spen)-Proteine. Diese zeichnen sich durch drei N-terminale RNA-Erkennungsmotive (RRM) und eine hoch

konservierte C-terminale SPOC-Domäne (<u>Spen paraloge und o</u>rthologe <u>C</u>-terminale Domäne) aus (4). Die Spen-Proteinfamilie findet sich in Nematoden, Fruchtfliegen und in Säugern. Humanes SHARP besitzt neben vier N-terminalen RRMs (Aminosäuren 7-589) fünf NLS, eine Rezeptor-Interaktionsdomäne (RID, Aminosäuren 2201-2707) und eine RBP Interaktionsdomäne (RBPID, Aminosäuren 2803-2817) (132, 155). Die C-terminale SPOC-Domäne (Aminosäuren 3477-3664) beinhaltet eine SMRT Interaktionsdomäne (SID) und die Repressionsdomäne (RD) (4, 155) (Abb. 1. 5).



**Abb. 1.5: Proteinstruktur von SHARP.** SHARP besitzt vier N-terminale RNA-Erkennungsmotive (RRM) und fünf nukleäre Lokalisationssignale (NLS). Am C-Terminus befinden sich die Rezeptor- (RID), die RBP- (RBPID) und die SMRT-Interaktionsdomäne (SID). Zusätzlich besitzt SHARP am C-Terminus eine Repressionsdomäne (RD). Die Zahlen geben die Aminosäureabschnitte der einzelnen funktionellen Domänen an. [Quelle: (132)].

Mint, das murine Ortholog zu SHARP, ist ein Bindepartner zu Msx-2, einem reprimierenden Transkriptionsfaktor. Zusammen mit Msx-2 reguliert Mint die Aktivität des Osteocalcin-Promotors (122). Mint Knock-Out-Embryonen sterben am Tag (E) 12,5-14,5 (85). Sowohl Mint als auch SHARP interagieren mit RBP-J $\kappa$  (85, 132). Die RD von SHARP ist für die Interaktion mit SMRT, HDACs, NcoR und CtIP verantwortlich (132, 155). Im Notch-Signaltransduktionsweg fungiert SHARP als Korepressor zu RBP-J $\kappa$  und hemmt die Transkription der Notch-Zielgene *HES1* und *Hey1* (132, 134). Mint und SHARP sind funktionelle Homologe zu *D. melanogaster* Hairless, das in dieser Spezies den wichtigsten Notch Antagonisten darstellt (117) 90, 139).

#### 1.5 ETO ("*Eight-<u>T</u>wenty-<u>O</u>ne")*

ETO, auch als <u>myeloides Translokationsg</u>en 8 (MTG8) oder CBFA2T1 bezeichnet, wurde erstmals als Teil des Fusionsproteins AML1/ETO (1.7) beschrieben (35, 114). Im Folgenden wird die Bezeichnung ETO beibehalten. Die ETO-Familie ist eine Multigenfamilie, die drei humane Mitglieder (ETO (CBFA2T1; MTG8); MTG16

(CBFA2T2); MTGR1 (CBFA2T3, EHT)) aufweist (20, 35, 44, 50, 78). In der Maus konnte ein direktes Homolog zu MTG16, ETO-2, in *Xenopus laevis* XETOR und XETO und in *D. melanogaster* Nervy gefunden werden (21, 25, 37). Jedes Mitglied der ETO-Familie besitzt spezifische Spleißvarianten, die sich in ihrer Funktion und subzellulären Lokalisation entsprechen (50, 70, 114, 118). Humanes ETO wird besonders stark in Gehirn, Herz und in hämatopoetischen Zellen exprimiert (33, 180). Eine geringere Konzentration an ETO wurde auch in Nieren, Plazenta und Lunge nachgewiesen (35). ETO-Proteine repräsentieren eine Familie aus fast ausschließlich nukleären Proteinen. ETO selbst besitzt ein starkes NLS zwischen Aminosäure 250 und 280 sowie subnukleäre Zielsignale (8, 123) (Abb. 1.6). Ausnahmen bilden im Gehirn Purkinje-Zellen, in denen ETO im Zytoplasma nachgewiesen wurde, und MTG16, dessen Isoformen sowohl im Zyoplasma als auch im Zellkern zu finden sind (67, 148).

ETO beinhaltet vier jeweils hoch konservierte funktionelle Domänen, die nach *D. melanogaster* Nervy als <u>Nervy homologe Regionen</u> (NHR) bezeichnet werden (37) (Abb. 1.6). Motive innerhalb der NHR1 weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit zu *D. melanogaster* TAFII110 und humanen TAF105 und TAF130 auf (35, 70). NHR2 ist für Homo- und Heterodimerisierungen von ETO-Proteinen verantwortlich (78, 97, 191). NHR3 besitzt eine *"coiled-coil"*-Struktur hat aber ansonsten keine Ähnlichkeit mit vorher beschriebenen Domänen (113, 138). Es wird davon ausgegangen, dass NHR3 bei Proteininteraktionen mit NHR4 zusammenarbeitet (70). NHR4 wird auch als MYND-Domäne (<u>My</u>eloides Translokationsgen 8-<u>Nervy-D</u>EAF1) bezeichnet (158). Sie enthält zwei Zinkfingermotive, die denen in BS69, BOP und DEAF1 entsprechen (54, 58, 158). Beide Zinkfingermotive sind jedoch nicht in der Lage, an die DNA zu binden (146).





NHR1-4 sind hauptverantwortlich für Interaktionen mit Korepressoren wie SMRT, NcoR, Sin3A und HDAC1-3 (3, 51, 90, 101, 172). Die Rekrutierung von HDAC durch

#### Einleitung

ETO verläuft sowohl direkt wie auch indirekt über die Interaktion mit Repressorproteinen, die ihrerseits HDACs binden (70). Da die Interaktion von ETO mit HDACs nur in vitro oder durch Überexpression nachgewiesen wurde, ist unklar welche HDACs tatsächlich für die biologische Funktion von ETO entscheidend sind. In Bezug auf die Interaktionen von ETO mit transkriptionellen Repressorproteinen, wurde ETO zuerst als nicht DNA-bindender Faktor beschrieben, dessen Funktion mit Chromatinrepression verbunden (146). Eine wichtige ist Rolle für die Repressorfunktion von ETO spielt dessen Oligomerisierung (191). Spätere funktionelle Analysen ergaben, dass ETO einen Korepressor zu Bcl-6 darstellt und somit an der Differenzierung von B-Zellen beteiligt ist (23). ETO fungiert ebenfalls als ein Korepressor für Atrophin-1, dem promyeloiden Leukämie Zinkfingerprotein PLZF und Gfi-1 (107, 109, 181). Die hohe Expressionsrate von ETO im Gehirn gibt Anlass zu der Annahme, dass ETO an der Kontrolle der Neurogenese beteiligt ist. Analysen zeigten, dass ETO in X. laevis und im Huhn die terminale Differenzierung von Neuronen fördert (84). X. laevis XETOR hemmt die Expression von proneuralen Genen (21). ETO-2 ist als Korepressor zu dem während der Erythropoese eine Rolle spielenden Transkriptionsfaktor TAL-1/SCL bekannt (53, 153).

#### 1.6 AML1/ETO

Das durch eine chromosomale Translokation entstehende Fusionsprotein AML1/ETO ist typisch für die <u>akute myeloische L</u>eukämie (AML) des <u>französischen-a</u>merikanischen-<u>b</u>ritischen (FAB)-Subtyps M2. Es tritt hier in 40 % der AML-Fälle auf und ist somit mit 18-20 % aller Leukämiefälle die am häufigsten auftretende chromosomale Translokation (95). AML1/ETO ist das Ergebnis einer Translokation zwischen Chromosom 21 und Chromosom 8. Die Bruchstellen liegen im *AML1*-Gen (Chromosom 21) zwischen Exon 5 und 6, im *ETO*-Gen (Chromosom 8) zwischen Exon 1a und 2 (136, 138, 165, 166). Die Translokation fusioniert den N-Terminus des Transkriptionsfaktors AML1 mit beinahe dem gesamten ETO, ausgenommen dessen ersten 30 Aminosäuren (Abb. 1.7) (114). Dadurch erhält ETO als zusätzliche funktionelle Domäne die AML1-Runt-Domäne (<u>Runt homologe D</u>omäne RHD) (Abb. 1.7). Die Benennung der AML1-Runt-Domäne erfolgte nach ihrer starken Sequenzähnlichkeit zu *D. melanogaster* Runt (93). Sie ist für die DNA-Bindung an der spezifischen Erkennungssequenz TG(T/C)GGT und für Interaktion mit Koaktivatoren zuständig (110, 138). Der wichtigste Interaktionspartner der Runt-

Domäne ist CBF $\beta$ . CBF $\beta$  und AML1 sind die Untereinheiten des <u>"core binding factor"</u> CBF. Dabei ist CBF $\beta$  die nicht DNA-bindende Einheit (124, 125, 159). Im Fusionsprotein behalten sowohl die Runt-Domäne als auch NHR1-4 ihre Funktion bei (138). Im Gegensatz zu ETO und AML1 kolokalisieren AML1/ETO und ETO im Zellkern (108, 123).



Abb. 1.7: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus von humanem AML1/ETO. AML1/ETO hat eine Länge von 751 Aminosäuren. Der AML1-Anteil stellt die ersten 177 Aminosäuren des Fusionsproteins. Sie beinhalten die AML1-Runt-homologe-Domäne (RHD). Der C-Terminus von AML1/ETO stellt beinahe das gesamte ETO-Protein mit den Nervy homologen Domänen NHR1-4.

Über Untersuchungen an AML1-Null Mäusen weis man, dass AML1 ein Schlüsselprotein für die Hämatopoese darstellt (130, 173). Ein Knock-Out beider Allele von AML1 sowie ein Knock-In von AML1/ETO in den AML1-Lokus führen zu einem Absterben der Mäuseembryonen. Es kommt in beiden Fällen zur Ausbildung eines annähernd gleichen Phänotyps, was sich im Verlust der embryonalen Hämatopoese in der Leber und durch Blutungen im ZNS äußert (129, 130, 189).

AML1/ETO wurde zuerst als dominant negativer Gegenspieler zu AML1 beschrieben, der die Expression von AML1-Zielgenen wie TCR $\beta$ , dem GM-CSF Rezeptor oder p14<sup>ARF</sup> hemmt (45, 98, 111). Neben der Hemmung von AML1-Zielgenen durch AML1/ETO wurden ebenfalls AML1-unabhängige Gene entdeckt, wie z.B. *MDR-1* ("<u>Multidrug resistance -1"</u>), die von AML1/ETO reprimiert werden (100). Zusätzlich blockiert AML1/ETO den TGF $\beta$ -Signalweg (73). Die Hemmung der Transkription wird dem ETO-Anteil des Fusionsproteins zugeschrieben, der für die Rekrutierung von Korepressoren verantwortlich ist (51, 101, 172). Auf der anderen Seite konnte AML1/ETO auch als transkriptioneller Aktivator identifiziert werden. Es aktiviert unter anderem zelltypspezifisch die Expression von M-CSF, c-Jun, C/EBP $\varepsilon$  und p21<sup>WAF1</sup> (32, 137, 144, 157).

Im Verlauf der Hämatopoese beeinflusst AML1/ETO Zelldifferenzierungs-, Proliferations- und Apoptosevorgänge (138). Untersuchungen mit stabil transfizierten hämatopoetischen Zelllinien wie 32D, L-G oder U937 zeigten, dass AML1/ETO die

Differenzierung von myeloiden und erythroiden Zellen blockiert (1, 19, 78, 80, 176). Durch eine Veränderung der Dauer der G1-Phase bzw. des Übergangs zwischen der G1- und der S-Phase beeinflusst AML1/ETO den Zellzyklus in Abhängigkeit des Zelltyps (19). In retroviral transfizierten CD34+ Zellen fördert AML1/ETO die Selbsterneuerung und blockiert deren Kolonieformierung (119). AML1/ETO verhindert außerdem die Differenzierung von erythroiden Zellen durch eine Inhibition der EPO unabhängigen Proliferation der Zellen (167). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass das onkogene Potential von AML1/ETO in der Blockade der Differenzierung und der Förderung der Proliferation von Stammzellen und frühen Vorläuferzellen liegt.

### 1.7 Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Arbeit ist die Charakterisierung von neuen Kofaktoren des RBP-J $\kappa$ /SHARP-Repressorkomplexes. Neue SHARP interagierende Proteine, die mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems identifiziert wurden, sollen untersucht werden. Die Interaktion mit SHARP und die Funktion dieser Proteine sollen *in vitro* und *in vivo* mit biochemischen Methoden wie GST-Pull-Down, Immunpräzipitationen und EMSA, mit zellbiologischen Methoden, wie Kolokalisationsversuche, und mit funktionellen Untersuchungen, wie Zielgenanalysen und Luciferase-Experimente charakterisiert werden. Weiterhin soll die Funktion dieser Faktoren sowohl innerhalb des RBP-J $\kappa$ -Korepressorkomplexes als auch im Notch-Signaltransduktionsweg untersucht werden.

## 2. Material

### 2.1 Zelllinien

Zelllinie	ATCC-Bezeichnung	Herkunft
HEK-293	CRL-1573	Humane Nierenzelllinie
HeLa	CCL2	Humane Zelllinie eines
		Gebärmutterhalskarzinoms
	DSMZ-Bezeichnung	
HEL	ACC 11	Humane Erythrozytenvorläuferzellen
Kasumi	ACC 220	Humane Myeloidenvorläuferzellen

### 2.2 Zellkulturmedien

Die Medien wurden von den Firmen GIBCO (Karlsruhe), Biochrom (Berlin) und PAA (Cölbe) bezogen.

D-MEM	+ 4,5 % Glukose, L-Glutamin
RPMI 1640	+ L-Glutamin
FCS	Endkonzentration 10 %
HEPES	Endkonzentration 1 %
L-Glutamin	Endkonzentration 1 %
Penicillin/Streptomycin	10.000 U/ml Penicillin G
	10.000 µg/ml Streptomycin
	Endkonzentration 1 %
Sodiumpyruvat	Endkonzentration 1 %
Trypsin-EDTA	5 %
G418	Endkonzentration 0.3 mg/ml

### 2.3 Bakterienstämme

Stamm	Firma	Genotyp
XL1-Blue	Stratagene (Heidelberg)	recA1 endA1 gyrA96 thi-1
		hsdR17 supE44 relA1 lac
		[F' proAB lac1 <sup>q</sup> Z∆M15
		Tn10 (Teť)]
BL21 D23	Invitrogen (Karlsruhe)	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal
		dcm (DE3)

### 2.4 Bakterienmedien

LB	10 g 5 g 10 g 15 g ad 1 I dest. H <sub>2</sub> C	Bacto-Trypton Bacto-Yeast Extrakt NaCl Bacto-Agar (bei Festmedien)
SOB	20 g 5 g 0,5 g 10 ml ad 1 I dest. H <sub>2</sub> C	Bacto-Trypton Bacto-Yeast Extrakt NaCl 250 mM KCl
Ampicillin	100 mg/ml (nac	h dem Autoklavieren zugeben)

## 2.5 Verwendete Puffer und Lösungen

## 2.5.1 Allgemeine Puffer

PBS (pH 7,5)	80 g 14,4 g 2 g 2 g ad 1 I dest. H <sub>2</sub> C	NaCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS-T (pH 7,5)	1 l 10 ml	PBS 10 % Tween-20
TAE	242 g 57,1 ml 100 ml ad 1 I dest. H <sub>2</sub> C	Tris/HCI Eisessig 0.5 M EDTA
TE	100 mM 10 mM	Tris/HCI (pH 7,5) EDTA

### 2.5.2 SDS-PAGE:

Laufpuffer	10 g 30 g 144 g ad 1 I dest. H <sub>2</sub> C	SDS Tris/HCI Glycin )
Sammelgel-Puffer	0,5 M	Tris/HCI (pH 6.8)
Trenngel-Puffer	1,5 M	Tris/HCI (pH 8.8)
Acrylamid-/Bisacrylamidstammlösung (	37.5 : 1)	

### 2.5.3 Coomassie-Brillantblau-Färbung

Coomassie-Färbelösung	50 ml 250 ml 0,7 g ad 500 ml dest.	100 % Essigsäure Methanol Brillantblau H <sub>2</sub> O
Entfärbelösung	70 ml 50 ml ad 1 l dest. $H_2C$	100 % Essigsäure Methanol )

### 2.5.4 Western-Blot:

Transferpuffer

3 g 11,26 g Tris/HCI Glycin 100 ml Methanol ad 1 I dest.  $H_2O$ 

#### 2.5.5 GST-Pull-Down:

Puffer A (50 ml)	2 ml 250 µl 20 µl 2,5 ml 2,5 ml ad 50 ml dest. H	1 M HEPES 1 M MgCl <sub>2</sub> 0.5 M EDTA 10 % NP-40 2 M KCI H <sub>2</sub> O
Puffer B (50 ml)	siehe Puffer A 7,5 ml	2 M KCI

#### 2.5.6 EMSA:

Bindepuffer (für 1 M NaCI)	500 µl	80 % Glycerol
	100 µl	1 M Tris/HCI (pH 7.5)
	200 µl	5 M NaCl
	200 µl	dest. H <sub>2</sub> O

5 x TGE	30,28 g	Tris/HCI
	142,7 g	Glycin
	3,92 g	EDTA
	ad 1 I dest.	H <sub>2</sub> O

Acrylamid-/Bisacrylamidstammlösung (19:1)

### 2.5.7 Zelllysepuffer:

307 mg CHAPS-Puffer (50 ml) CHAPS 1 M Tris/HCI (pH 7.8) 2,5 ml 7,5 ml 1 M NaCl 40 µl Complete Mix (pro ml Puffer) 10 µl 0.5 M NaF (pro ml Puffer) 100 mM PMSF (pro ml Puffer) 5 µl ad 50 ml dest. H<sub>2</sub>O Laemmli-Puffer (10 ml) 0,424 g Tris/HCI (pH 6.8) 1,028 g SDS 4,5 ml 80 % Glycerin 500 µl 5 % Mercaptoethanol 1,2 mg Bromphenolblau

#### 2.6 Antikörper

#### 2.6.1 Primärantikörper

Antikörper	Firma	
Anti-ETO (polyklonaler IgG, Ziege)	Santa Cruz (sc-9737), Heidelberg	
Anti-ETO2 (polyklonaler IgG, Ziege)	Santa Cruz (sc-9741), Heidelberg	
Anti-HDAC1 (monoklonaler IgG <sub>1</sub> , Maus))	Upstate (Klon 2E10), Hamburg	
Anti-RBP-J $\kappa$ (monoklonaler IgG, Ratte)	Institute of Immunology (T6709),	
	Hamaguchi et a., 1992	
Anti-SHARP (polyklonal, Kaninchen)	BioGenes, Berlin (132)	
Anti-Flag M5 (monoklonaler IgG <sub>1</sub> , Maus)	, Maus) Sigma (F 4042), Deissenhofen	

## 2.6.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Firma
Anti-Maus IgG Peroxidase-markiert	GE Healthcare, Freiburg
Anti-Ratte IgG Peroxidase-markiert	Dianova, Hamburg
Anti-Ziege IgG Peroxidase-markiert	Jackson ImmunoResearch, Hamburg
Anti-Maus IgG Alexa 647	Molecular Probes, Oregon
Anti-Kaninchen IgG Alexa 647	Molecular Probes, Oregon
Anti-Kaninchen IgG Cy3	Molecular Probes, Oregon
Anti-Ziege IgP FITC	Sigma, Deissenhofen

## 2.7 Vektoren

Vektor	Firma
pcDNA3(-Flag1/Flag3)	Invitrogen (Karlsruhe)
pGEX-6-P1	GE Healthcare (Freiburg)
pGBT9	Clontech (Heidelberg)
pFA-CMV	Stratagene (Heidelberg)
pFR-Luc	Stratagene (Heidelberg)

## 2.8 Enzyme

New England Biolabs (Schwalbach)	Acc65 I, BamH I, EcoR I, EcoR V, Hind III,
	Kpn I, Not I, Nsi I, Sma I, Xba I, Xho I
	Klenow
	Сір
	T4-Ligase
Invitrogen (Karlsruhe)	Taq-Polymerase
Merck (Darmstadt)	Benzonase

## 2.9 Oligonukleotide

## 2.9.1 Standard-PCR

Name	Sequenz
ETO-N up	5'-GCGAATTCAAATATCTGTCAAAAGAAACACTTGG-3'
ETO-N down	5'-GCCTCGAGCTACAAACGGTAATGCTGAGGTG-3'
ETO-C up	5'-AGCGATATCACCTCCACCTCAGCATTACC-3'
ETO-C down	5'-GCCTCGAGCTAGCGAGGGGTTGTCTC-3'
ETO (297/401) up	5'-AGCGATATCACCTCCACCTCAGCATTACC-3'
ETO (297/401) down	5'-GCCTCGAGCTAGTCCTCGGCGTCACTGTAC-3'
ETO (297/480) up	5'-AGCGATATCACCTCCACCTCAGCATTACC-3'
ETO (400/604) up	5'-AGCGATATCAGAGGACTTAAAAAAAGGTGGCGG-3'
ETO (400/604) down	5'-GCCTCGAGCTAGCGAGGGGTTGTCTC-3'
ETO-eGFP up	5'-GCAGACCGGGAAGAATTGAATTAC-3'
ETO-eGFP down	5'-GCCTCGAGGCGAGGGGTTGTCTCTATG-3'

## 2.9.2 Quantitative Real-Time-PCR

## MEL-Zellen (4.3.2):

Name	Sequenz
HES1 3'-UTR up	5'-GCCCAGACGGATGAGTTC-3'
HES1 3'-UTR down	5'-CCCTGCTTGAAGGGAAAAAC-3'
Hey1 3'-UTR up	5'-CCATTTGATCCTCTGAATTGG-3'
Hey1 3'-UTR down	5'-GATTGAGTTCCAGCACCACA-3'
HES1 Promotor up	5'-GCCAGACCTTGTGCCTAGC-3'
HES1 Promotor down	5'-TCTTTCCCACAGTAACTTTCAGC-3'
Nrarp enhancer up	5'-TCCTCTTCTACCAGGTGTCTG-3'
Nrarp enhancer down	5'-GGGGCTTCCAGCTAATTCAT-3'

Name	Sequenz
Aktin up	5'-GACGTGGCAGAGAAGTACCTG-3'
Aktin down	5'-GGGCAGTTCCAACGATGT-3'
Hey2 up	5'-CCAGCAGTGCATCAGTATGTC-3'
Hey2 down	5'-CAGGCACTTACGAAACACGA-3'
P21 <sup>WAF1</sup> up	5'-TCACTGTCTTGTACCCTTGTGC-3'
P21 <sup>WAF1</sup> down	5'-GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA-3'

## 293-HEK-Zellen (4.6):

## 2.9.3 Klonierung von AML1/ETO(tr)

Name	Sequenz
Oligo 1	5'-gatccGGCGGTACAGTGACGCCGAGGACTTAAAAAAAGGTGGCGGCAGc-3'
Oligo 2	

## 2.10 Reaktionssysteme

ECL <sup>™</sup> Streptavidin-HRP conjugate and	GE Healthcare
Blocking Reagent Kit	(Freiburg)
EndoFree <sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
GFX <sup>™</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare
	(Freiburg)
Luciferase Assay System	Promega (Heidelberg)
Nanofectin Kit	PAA (Cölbe)
ProFection <sup>®</sup> Mammalian Transfection System-	Promega (Heidelberg)
Calcium Phosphate	
TNT <sup>®</sup> T7 Coupled Reticulocyte Lysate Systems	Promega (Heidelberg)
+ RNAsin	
Wizard <sup>®</sup> Plus SV Minipreps	Promega (Heidelberg)

### 2.11 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Applichem (Darmstadt), Biozym (Oldendorf), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Riedel-de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Geissenhofen) bezogen.

Des Weiteren wurden folgende Chemikalien eingesetzt:

1 kb DNA Ladder 10 x PCR-Puffer (- MgCl<sub>2</sub>) Anti-Flag<sup>®</sup> M2 Affinity Gel Biotinyliertes dATP Bradford Reagenz CHAPS Complete Mix DAPT ECL<sup>™</sup> Western Blotting Detection Reagents

Gelatine from cold water fish skin Glutathion Sepharose<sup>TM</sup> 4B Beads

High-Range Rainbow Molecular Weight Marker

MgCl<sub>2</sub> (50 mM) Mounting Medium

Nick<sup>™</sup> Columns G50

Orange G Poly-dldC

Protein G Sepharose Beads

Invitrogen (Karlsruhe) Invitrogen (Karlsruhe) Sigma (Deissenhofen) Invitrogen (Karlsruhe) BioRad (München) Applichem (Darmstadt) Roche (Mannheim) Calbiochem (Bad Soden) **GE Healthcare** (Freiburg) Sigma (Deissenhofen) **GE Healthcare** (Freiburg) **GE Healthcare** (Freiburg) Invitrogen (Karlsruhe) Immunotech (Marseille, Frankreich) GE Healthcare (Freiburg) Merck (Darmstadt) **GE Healthcare** (Freiburg) **GE Healthcare** (Freiburg)

Streptavidin Sepharose Säule

GE Healthcare (Freiburg)

An radioaktiven Chemikalien wurden eingesetzt: [<sup>35</sup>S], [<sup>32</sup>P]

## 2.12 Verbrauchsmaterialien

Bakterienkultursch	alen	Greiner (Nürtingen)	
Deckgläser		Roth (Karlsruhe)	
Einmalküvetten		Ratiolab (Dreieich)	
High Performance Chemiluminescence Film		GE Healthcare	
		(Freiburg)	
Kodak BioMax MR	Film	Kodak (Rochester, USA)	
Neubauer Zählkam	nmer		
Objektträger		Roth (Karlsruhe)	
PCR-Tubes		Peqlab (Erlangen)	
Polystyrolröhrchen		BD Falcon (Heidelberg)	
PVDF-Membran		Millipore (Eschborn)	
Quarzküvette		VWR (Darmstadt)	
Safe –Lock Eppen	dorfgefäße	Eppendorf (Hamburg)	
Silikonisierte Eppe	ndorfgefäße	Eppendorf (Hamburg)	
Zellkulturschalen:	Gewebekulturplatte 96-Well	Nunc (Wiesbaden)	
	Gewebekulturplatte 24-Well	Greiner (Nürtingen)	
	Gewebekulturplatte 6-Well	Greiner (Nürtingen)	
	Gewebekulturplatte 10 cm	Greiner (Nürtingen)	
	Kammerdeckglas, Lab-Tek	Nunc (Wiesbaden)	
	Gewebekulturflaschen 250 ml	Greiner (Nürtingen)	

### 2.13 Geräte

Agarosegelkammer	Hoefer (Heidelberg)
Fluoreszenzmikroskop	Olympus
Geltrockner Speed Gel 2106	Savant (NY, USA)
Inkubatoren	Heraeus (Hanau)
Inkubationsschüttler Certomat R	Braun (Melsungen)

Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B Kühlzentrifuge Multifuge S-R Lumineszenzgerät Lumat LB 9501 pH-Meter Microprocessor pH 537 Peltier Thermocycler PTC-200 Photometer (DNA/Proteine) Pipetten Protein-Minigel-Apparatur Protein-Transferapparatur Sonificator Szintillationszähler Rackbeta 1219 Tischzentrifuge Modell 5417 R UV-Illuminator Modell 2011

Überkopfmischer Reax2

DuPont (Bad Homburg) Heraeus (Hanau) Berthold (Bad Wildbad) WTW (Weilheim) Biozym (Oldendorf) Eppendorf (Hamburg) Abimed (Langenfeld) BioRad (München) Keutz (Reiskirchen) Heinemann (Schwäbisch Gmünd) LKB (Uppsala, Schweden) Eppendorf (Hamburg) LKB (Uppsala, Schweden) Heidolph (Schwabach)

### 3. Methoden

#### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivierung humaner Zelllinien

Die Zelllinien 293-HEK und HeLa wurden in 10 ml D-MEM Medium, dem 10 % FCS und jeweils 1 % Penicillin und Streptomycin zugesetzt wurden, in 10 cm Erreichen Kulturschalen kultiviert. Bei einer konfluent bewachsenen Gewebekulturschale erfolgte die Subkultivierung der Zellen. Hierfür wurden die Zellen mit 37 °C warmen PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für ungefähr 2 min bei 37 °C inkubiert. Bei 293-HEK-Zellen erfolgte keine Inkubation nach Trypsinzugabe, da diese Zellen nur schwach adhärent sind. Anschließend wurden die Zellen in 8 ml Medium aufgenommen, in einer Neubauer Zählkammer gezählt und in der entsprechenden Verdünnung (jeweils 0,3 Mio. Zellen/Schale) auf 10 cm Gewebekulturschalen ausplattiert.

Die HEL-Zelllinie wurde in RPMI Medium mit 10 % FCS in 250 ml Flaschen kultiviert. Das Medium enthielt zusätzlich 5 % L-Glutamin und je 1 % Penicillin und Streptomycin. Die Kultivierung von Kasumi-Zellen erfolgte ebenfalls in 250 ml Flaschen in RPMI Medium, dem 20 % FCS, 5 % 1M HEPES und 5 % Sodiumpyruvat zugesetzt wurden. Das Medium für Kasumi-Zellen enthielt keinen Zusatz der Antibiotika Penicillin und Streptomycin. Die Subkultivierung erfolgte bei beiden Zelllinien dreimal pro Woche. HEL-Zellen wurden dabei jeweils auf 0,06 Mio. Zellen/ml Medium, Kasumi-Zellen auf 0,2 Mio. Zellen/ml Medium verdünnt. Alle Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gehalten.

#### 3.1.2 Lagerung und Reaktivierung von Stammkulturen

Für die Aufbewahrung der Zelllinien wurden jeweils ungefähr 10<sup>6</sup> Zellen abzentrifugiert (181 g, 7 min). Das Zellpellet wurde in 1 ml kaltem FCS, versetzt mit 10 % DMSO, resuspendiert und zunächst bei - 80 °C eingefroren. Die langfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zur Reaktivierung eingefrorener Zellstocks wurden diese im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und in vorgelegtem Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für 6 min bei 181 g abzentrifugiert und die Zellpellets in 5 ml Medium aufgenommen. Nach Zählung in einer Neubauer Zählkammer wurden die Zellen in entsprechender Verdünnung (3.1.1) auf 10 cm Kulturschalen ausplattiert.

### 3.1.3 Transiente Transfektion mit CaCl<sub>2</sub>/Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>

293-HEK-Zellen wurden mit Hilfe der  $CaCl_2/Ca_3(PO_4)_2$  Kopräzipitationsmethode transfiziert. Diese Transfektionsmethode wurde erstmals von Graham und van der Eb (1973) beschrieben (55). Sie beruht darauf, dass sich bei der Vermischung von  $CaCl_2$  und einem Natriumphosphatpuffer ein Niederschlag von  $Ca_3(PO_4)_2$  bildet. Dieser interagiert mit der DNA. Die dabei ausfallenden DNA-Kristalle können von den Zellen mittels Endozytose aufgenommen werden.

Für diese Transfektionsmethode wurde der ProFection<sup>®</sup>Mammalian Transfection System Kit von Promega verwendet. Die Zellen wurden am Vortag ausgesät, so dass sie am Tag der Transfektion semikonfluent waren, um eine möglichst hohe Transfektionseffizienz zu erreichen. Folgende Ansätze wurden für die Transfektion der Zellen in 25-Well, 6-Well und 10 cm Gewebekulturschalen verwendet (Tabelle 3.1):

	25-Well	6-Well	10 cm
H <sub>2</sub> O	ad 75 µl	Ad 150 µl	ad 500 µl
DNA	1 µg	2 µg	15 µg
2 M CaCl₂	9,25 µl	18,5 µl	62 µl
2 x HBS Puffer	75 µl	150 µl	500 µl

Tab 3.1: Pipettierschema für Transfektion von Zellen in 25-Well, 6-Well und 10 cm Gewebekulturschalen.

Für die Transfektion wurde die DNA mit H<sub>2</sub>O und 2 M CaCl<sub>2</sub> vermischt. Unter Vortexen wurde anschließend das DNA-Gemisch tropfenweise zu 2 x HBS Puffer pipettiert und 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Transfektionsansatz nochmals durch Vortexen gut durchmischt und auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden bei 37 °C für ca. 18 h inkubiert.
# 3.1.4 Transiente Transfektion mit Nanofectin

HeLa-Zellen wurden mit Hilfe von Nanofectin (PAA) transfiziert. Diese Methode beruht darauf, dass die DNA von einem positiv geladenen Polymer gebunden wird und anschließend mit Nanopartikeln einen Komplex bildet. Dieser Komplex kann von den Zellen aufgenommen werden.

Für die Transfektion wurden die Zellen am Vortag auf 24 Well Gewebekulturschalen ausgesät. Die Transfektion wurde nach dem Protokoll des Herstellers PAA durchgeführt. Die Zellen wurden nach der Transfektion für 18-24 h bei 37 °C inkubiert.

# 3.2 Molekularbiologische Methoden

# 3.2.1 Kultivierung und Lagerung von E. coli Bakterien

Um Einzelkolonien von *E. coli* Bakterien zu erhalten, wurden diese in einem Verdünnungsausstrich auf Carbenicillin enthaltenden LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Für eine Flüssigkultur wurde LB-Medium mit entsprechender Menge 1000 x Ampicillin versetzt. Anschließend wurden Einzelkolonien gepickt, in das LB-Medium überführt und bei 37 °C über Nacht unter Schütteln (220 rpm) inkubiert.

Zur längerfristigen Lagerung wurden 850  $\mu$ l einer auf eine OD<sub>600</sub> von 0,6 (entspricht 5 x 10<sup>8</sup> Bakterien) eingestellten Flüssigkultur mit 150  $\mu$ l 86 % Glycerol vermischt und bei – 80 °C gelagert.

### 3.2.2 Transformation chemisch kompetenter E. coli Bakterien

Für jeden Transformationsansatz wurden 50 µl XL1-Blue *E. coli* Bakterien verwendet. Die Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 1 µg Plasmid-DNA bzw. 10 µl Ligationsansatz (3.2.12) zugegeben und vorsichtig mit den Bakterien vermischt. Der Ansatz wurde zunächst 20 min auf Eis inkubiert, damit die DNA sich an die Bakterien anlagern kann. Es folgte ein Hitzeschock für 2 min bei 42 °C und nochmals eine Inkubation für 2 min auf Eis. Die Bakterien wurden im Anschluss mit 600 µl SOB für 1 h bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Danach wurde der gesamte Transformationsansatz entweder auf eine LB-Agarplatte ausgestrichen und für ungefähr 16 h bei 37 °C inkubiert oder in LB-Medium, dem zuvor Ampicillin zugegeben wurde, aufgenommen und unter Schütteln (220 rpm) bei 37 °C inkubiert.

#### 3.2.3 Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli

Für die Präparation von kleinen Mengen an Plasmid-DNA ( $\emptyset$  150 ng/µl) aus *E. coli* Bakterien wurde der Wizard<sup>®</sup>Plus SV Miniprep Kit von GE Healthcare verwendet. Hierfür wurden Einzelkolonien gepickt, in 3 ml LB-Medium aufgenommen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Der Aufschluss der Bakterien und die Aufreinigung der DNA erfolgten nach den Anweisungen des Protokolls des Herstellers GE Healthcare. Die DNA wurde in jeweils 100 µl demin. H<sub>2</sub>O eluiert. So gewonnene DNA wurde für Restriktionsverdaus (3.2.7) und Sequenzierungen (3.2.12) verwendet.

Um größere Mengen Plasmid-DNA ( $\emptyset$  3 µg/µl) zu erhalten, wurde der EndoFree<sup>®</sup> Plasmid Maxi Kit von Qiagen verwendet. Zu diesem Zweck wurden transformierte Bakterien (3.2.2) in 100 ml LB-Medium aufgenommen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien bei 5000 rpm abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Zur Lyse wurden die Bakterien mit 10 ml Lysepuffer P2 versetzt und für 5 min inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 10 ml Neutralisationspuffer P3 gestoppt und ausgefallene Proteine und Zellmembranen aus dem Lysat gefiltert. Anschließend wurde das Lysat mit ER Puffer zur Entfernung bakterieller Endotoxine für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Aufreinigung der DNA wurden Qiagen-tip 500 Säulen verwendet. Die Säulen wurden zunächst mit 10 ml Equilibrierungspuffer (QBT) equilibriert. Danach wurde das DNA-Lysat auf Säule gegeben. Es folgte ein zweimaliger Waschschritt mit je 30 ml Waschpuffer QC. Die DNA wurde im Anschluss mit 15 ml Elutionspuffer QN von der Säule gewaschen und mit 10,5 ml 2-Propanol unter Zentrifugation (5000 rpm, 40 min, 4 °C) gefällt. Danach wurde das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 100 µl TE aufgenommen. Alle verwendeten Puffer sind Bestandteil des EndoFree® Plasmid Maxi Kits von Qiagen. Die Konzentration wurde wie unter 3.2.4 beschrieben bestimmt. Mit dieser Plasmid-DNA wurden Transfektionen von Zellen (3.1.3, 3.1.4) durchgeführt.

#### 3.2.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Für die Konzentrationsbestimmung wurde die DNA in einer 1:100 Verdünnung in Wasser aufgenommen. Die Messung erfolgte bei 260 nm und 280 nm. Die Konzentration der DNA ergab sich aus dem Messwert bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor und einem spezifischen Multiplikationsfaktor. Das Verhältnis der Messwerte bei 260 nm und 280 nm bestimmt den Reinheitsgrad der DNA. Im Idealfall sollte das Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

#### 3.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA aus 293-HEK-Zellen wurde nach dem Protokoll des RNeasy Mini Kits von Qiagen verfahren. Hierfür wurden jeweils 2 x  $10^6$  Zellen verwendet. Die isolierte Gesamt-RNA wurde in 60 µl RNase freiem Wasser eluiert. Die isolierte Gesamt-RNA wurde als Vorlage für die cDNA-Erststrangsynthese verwendet, die anschließend für eine quantitative Real-Time-PCR eingesetzt wurde (3.2.6).

### 3.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### A. Standard-PCR unter Verwendung der Taq-DNA-Polymerase

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine effektive Methode, um sehr geringe Ausgangsmengen an DNA in kurzer Zeit exponentiell zu vervielfältigen. Die Standard-PCR wurde zur Herstellung verkürzter ETO und AML1/ETO-Varianten eingesetzt. Als Polymerase wurde die Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet. Ein PCR-Ansatz (insgesamt 100  $\mu$ I) setzte sich folgendermaßen zusammen:

78 µl
10 µl
2 µl
2 µl
4 µl
2 µl
1 μl (= 0,5 μg DNA)
1 µl (5 U/µl)

Die Taq-DNA-Polymerase, der 10 x Puffer und das MgCl<sub>2</sub> wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

95 °C		5 min
	95 °C	30 sec
	X °C	30 sec
	72 °C	30 sec-1 min
72 °C		7 min

Jede PCR-Reaktion verlief über 30 Zyklen. In Abhängigkeit der verwendeten Oligonukleotide lag die Annealing-Temperatur (X) zwischen 55 °C und 60 °C. Die Oligonukleotide sind unter 2.9 aufgeführt. Über die Oligonukleotide wurden für eine spätere Klonierung in entsprechende Vektoren Schnittstellen an den Enden der PCR-Produkte eingefügt. Die Elongationszeit richtete sich nach der Länge der DNA-Vorlage.

Das erhaltene PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel (3.2.10)extrahiert und für eine Ligation mit den entsprechenden Restriktionsenzymen inkubiert (3.2.7). Anschließend wurde es mit dem entsprechenden Vektor ligiert (3.2.11) und zur Kontrolle seguenziert (3.2.12).

### B. Herstellung von cDNA mittels Reverser Transkription

Mit Hilfe einer reversen Transkriptase kann aus RNA unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide cDNA hergestellt werden. Für die Erststrangsynthese wurde Gesamt-RNA verwendet, die zuvor aus transient transfizierten 293-HEK-Zellen isoliert wurde (3.2.5).

Zur Erststrang-Synthese wurde der SuperScript<sup>TM</sup> II Reverse Transkriptase Kit von Invitrogen verwendet. Hierfür wurden 2 µl (entspricht ca. 2 µg) Gesamt-RNA mit 1 µl Random Primern (100 ng/µl), 1 µl dNTP-Mix (10 mM) und 9 µl DEPC behandeltem Wasser für 5 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 4 µl 5 x Firststrand Puffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl (200 U) SuperScript<sup>TM</sup> II Reverser Transkriptase zugegeben und 1 h bei 42 °C inkubiert. Die Transkriptase wurde danach bei 70 °C (15 min) hitzeinaktiviert.

# C. Quantitative Real-Time-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR erfolgte nach dem FastStart Universal Probe Master (ROX) Protokoll von Roche. Die hierfür verwendeten Primer sind unter 2.9.2 aufgeführt.

## 3.2.7 Annealing von Oligonukleotiden zu doppelsträngiger DNA

Die komplementären Oligonukleotide (2.9.3) wurden zunächst auf 100 pmol/µl eingestellt. Jeweils 10 µl der Oligonukleotide wurden mit 1,8 µl 5 M NaCl und 8,2 µl  $H_2O$  für 5 min aufgekocht und anschließend über Nacht langsam auf RT abgekühlt. Durch Zugabe von 70 µl TE wurde die Konzentration der Oligonukleotide auf 10 pmol/µl eingestellt.

# 3.2.8 Herstellung von DNA-Fragmenten mit Restriktionsenzymen

Von den drei Kategorien an Restriktionsenzymen sind die des Typs II für molekularbiologisches Arbeiten besonders interessant. Sie schneiden DNA an genau definierten Stellen von vier, sechs oder acht Basen. Man spricht hier von 4-, 6- oder 8-*"cuttern*". Die DNA-Erkennungssequenzen dieser Restriktionsenzyme sind palindromisch, d.h. in beiden Strängen gleich. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind unter 2.8 aufgelistet.

Für einen Verdau wurden 1-1,5 µg DNA in einem Reaktionsvolumen von 30 µl oder 60 µl eingesetzt. Der 10 x Reaktionspuffer wurde in Abhängigkeit des verwendeten Enzyms nach Empfehlung des Herstellers (New England Biolabs) ausgewählt und im Verhältnis 1:10 dem Reaktionsansatz zugegeben. Es wurde immer 1 µl (20 U/µl) des entsprechenden Enzyms eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden normalerweise bei 37 °C für 1 h inkubiert. Eine Ausnahme bilden Verdaus mit dem Enzym Sma I, dessen Temperaturoptimum bei 25 °C liegt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die geschnittenen DNA-Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Agarosegel aufgereinigt (3.2.10).

# 3.2.9 Herstellung von glatten 5'-Enden mittels Klenow-Polymerase

Die Klenow-Polymerase, auch als Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I bezeichnet, aus *E. coli* besitzt die Eigenschaft, 5'-Überhänge aufzufüllen und somit glatte Enden herzustellen. Zu diesem Zweck wurde der Reaktionsansatz nach Beendigung des Restriktionsverdaus mit 2  $\mu$ I 10 mM dNTP-Mix und 1  $\mu$ I (5 U/ $\mu$ I) Klenow versetzt und für 15 min bei RT inkubiert.

# 3.2.10 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Für eine Ligation von DNA-Fragmenten und Vektor-DNA werden die Phosphatreste, die nach einem Restriktionsverdau an den 5'-Enden zurückbleiben, benötigt.

Um zu verhindern, dass nach einem Verdau die freien Enden der Vektor-DNA vor der eigentlichen Ligation wieder religieren, wurden diese dephosphoryliert. Hierfür wurde die alkalische Phosphatase Cip, die aus dem Kälberdarm gewonnen wird, verwendet.

Für die Dephosphorylierung wurde die linearisierte Vektor-DNA (3.2.7) zunächst aufgereinigt (GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare) und in 44  $\mu$ l demin. H<sub>2</sub>0 aufgenommen. Anschließend wurde sie mit 1  $\mu$ l (10 U/ $\mu$ l) Cip und 5  $\mu$ l 10 x Cip-Puffer (Puffer 2, New England Biolabs) für 1 h bei 37 °C inkubiert.

# 3.2.11 Elektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten einer Größe zwischen 500 bp und 7 kb wurden 1 % Agarosegele verwendet. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen Auftragspuffer (80 % Glycerol, Orange G) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 150 mV. Als Gel- und Laufpuffer diente TAE-Puffer.

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden diese zuerst unter UV-Licht aus dem Gel herausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des  $GFX^{TM}$  PCR DNA and Gel Band Purification Kits von GE Healthcare. Vektor-DNA wurde in 35-50 µl demin. H<sub>2</sub>O aufgenommen, kleinere DNA-Fragmente in 20-30 µl demin. H<sub>2</sub>O.

### 3.2.12 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Ein Ligationsansatz von 20 µl wurde folgendermaßen pipettiert:

Vektor-DNA	1 µI
DNA-Fragment	6 µl
10 x Ligase-Puffer	2 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl (400 U/µl)
H <sub>2</sub> O	10 µl

Zusätzlich wurde ein Reaktionsansatz zur Vektorkontrolle hergestellt, der nur die Vektor-DNA enthielt. Die Ligation wurde entweder über Nacht bei RT oder über 2 Tage bei 4 °C inkubiert.

# 3.2.13 Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) durchgeführt.

#### 3.3 Proteinbiochemische Methoden

### 3.3.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Zellkulturen

Transfizierte Zellen (3.1.3) einer konfluent bewachsenen Kulturschale wurden zuerst mit kaltem PBS 1 x gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 600  $\mu$ l CHAPS-haltigem Zelllysepuffer geerntet und für 1 h 30 min auf Eis inkubiert. Nicht lösliche Zellreste wurden danach bei 20.800 g (30 min, 4 °C) abzentrifugiert. Die Proteinextrakte wurden bei – 20 °C gelagert und für Immunpräzipitationen (3.3.8) und SDS-PAGE-Analysen (3.3.4) weiter verwendet.

### 3.3.2 Herstellung von Proteinlysaten mit Laemmli-Puffer

Zur Herstellung von Laemmli-Proteinlysaten aus Bakterien wurde aus einer am Vortag angesetzten Bakterienkultur 1 ml entnommen und bei 20.800 g für 1 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 100  $\mu$ l Laemmli-Puffer, dem 2  $\mu$ l (25 U/ $\mu$ l) Benzonase zugesetzt wurden, resuspendiert und für 20 min auf Eis lysiert.

Für die Herstellung von Laemmli-Lysaten aus 293-HEK-Zellen wurden die Zellen auf 6-Well Gewebekulturschalen ausplattiert und am Vortag transfiziert (3.1.3). Die Zellen wurden mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und anschließend in 100  $\mu$ l Laemmli-Puffer/Well, versetzt mit 2  $\mu$ l (25 U/ $\mu$ l) Benzonase, aufgenommen. Danach wurden die Zellen ebenfalls 20 min auf Eis lysiert.

Anschließend wurden die Lysate bei 95 °C für 5 min aufgekocht und Zelltrümmer durch Zentrifugation (20.800 g, 1 min, 4 °C) entfernt. Der Überstand wurde bei – 20 °C eingefroren. Die Analyse des Überstands erfolgte mittels SDS-PAGE (3.3.4) und Western-Blot (3.3.6/7).

### 3.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten

Der Bradford-Test ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Durch die Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brillantblau G-250 (Triphenylmethan-Farbstoff) an die basischen Seitenketten von Proteinen verschiebt sich dessen Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm. Die Stärke der Verschiebung lässt sich quantitativ bestimmen und gibt somit einen Rückschluss auf die Proteinkonzentration (12).

Zu 1 ml Bradford-Reagenz wurden 2  $\mu$ l des Proteinlysats (3.3.1) gegeben und durch vortexen gut durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT wurde die Probe am Photometer gemessen. Als Standard wurde eine BSA-Lösung, eingestellt auf 1  $\mu$ g/ $\mu$ l, verwendet.

### 3.3.4 Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli eingesetzt (88).

Für Proteine zwischen 20 kDa und 50 kDa wurden 12 % Trenngele verwendet, für Proteine ab 50 kDa in der Regel 10 % Trenngele. Die Zusammensetzung der Gele ist in der nachfolgenden Tabelle 3.2 angegeben. Die Angaben gelten für jeweils zwei Gele und sind ausreichend für Gele einer Fläche von 9 x 6 cm und einer Dicke von 0,75 cm.

	Trenngel		Sammolgol
	10 %	12 %	Jammerger
H <sub>2</sub> O	4,1 ml	3,4 ml	3,0 ml
TG/SG*-Puffer	2,6 ml	2,6 ml	1,3 ml
30 % AA	3,3 ml	4,0 ml	750 µl
10 % SDS	100 µl	100 µl	50 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	25 µl	25 µl	15 µl

Tab. 3.2:	Pipettierschema	für Trenn-	und	Sammelo	qele
				••••••	

\* TG: Trenngel; SG: Sammelgel

Die Polymerisierungsreaktion wurde durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED gestartet. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgekocht. Für die Elektrophorese wurden 20 mA pro Gel eingestellt. Als Größenmarker wurde der High-Range Rainbow Molecular Weight Marker von GE Healthcare eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend entweder auf eine Membran geblottet (3.3.6) oder im Trenngel fixiert und mit Coomassie-Brillantblau angefärbt (3.3.5).

#### 3.3.5 Anfärbung von Proteinen in Acrylamid-Gelen

Zur Visualisierung von aufgetrennten Proteinen in einem Polyacrylamidgel wurden die Gele nach der Elektrophorese für 1 h in einer methanolhaltigen Coomassie-Brillantblau-Färbelösung bei RT geschwenkt. Der Farbstoff färbt unspezifisch alle Proteine im Gel. Nach der Färbung wurden die Gele zur Herabsetzung des Hintergrunds für mindestens 12 h unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung wieder entfärbt. Die untere Nachweisgrenze bei dieser Methode liegt bei 0,2 µg Protein pro Proteinbande.

#### 3.3.6 Elektrotransfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western-Blot)

Nach der SDS-PAGE (3.3.4) wurden die aufgetrennten Proteine mittels eines angelegten elektrischen Feldes auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierfür wurde

eine Halbtrockenzelle mit Kohleelektroden verwendet. Vor dem Transfer wurde die PVDF-Membran mit Methanol aktiviert und mit Transferpuffer befeuchtet. Der Aufbau für den Transfer sah folgendermaßen aus. Auf die mit Transferpuffer befeuchtete Anode wurden drei Lagen ebenfalls mit Transferpuffer getränkten Whatman-Papier gelegt. Darauf wurde die PVDF-Membran gelegt, auf der das Gel platziert wurde. Den Abschluss bilden wiederum drei Lagen feuchten Whatman-Papiers. Der Transfer erfolgte bei 250 mA für 1 h.

#### 3.3.7 Immunfärbung von membrangebunden Proteinen

Nach dem Western-Blot (3.3.6) wurde die Membran zunächst für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in Blockpuffer (PBS-T + 2-3 % Milchpulver) geschwenkt. Dadurch werden alle unspezifischen Proteinbindungsstellen abgesättigt. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit Primärantikörper inkubiert. Überschüssiger Primärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen (je 10 min) in PBS-T entfernt. Es folgte eine Inkubation der Membran mit Sekundärantikörper für 1 h bei RT. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde wiederum durch dreimaliges Waschen (je 10 min) in PBS-T entfernt. Alle Antikörper wurden entsprechend der Empfehlung der Hersteller in Blockpuffer verdünnt. Nach dem letzten Waschschritt wurde die Membran mit dem ECL-System von GE Healthcare nach Angaben des Herstellers entwickelt. Die Exposition von "High Performance Chemiluminescence" Filmen erfolgte bei RT.

Für eine zweite Färbung der Membran mit einem weiteren Primärantikörper musste der zuerst verwendete Antikörper entfernt werden. Hierfür wurde die Membran zunächst für 10 min mit 100 mM Glycin (pH 2,5) behandelt. Anschließend wurde sie für weitere 10 min in 100 mM Tris (pH 8,8) inkubiert. Danach konnte die Membran wie oben beschrieben geblockt und mit weiteren Antikörpern gefärbt werden.

#### 3.3.8 Immunpräzipitation (IP)

#### A. IP mit immobilisierten Antikörpern

Für diese Methode wurden M2-Flag-Beads der Firma Sigma verwendet. Es handelt sich hierbei um Agarose-Kügelchen, die mit anti-Flag-Antikörper beschichtet sind. Die M2-Flag-Beads wurden zuvor 5 x mit 1 ml PBS (+ 0,5 % BSA) gewaschen (je

420 g, 1 min, 4 °C) und in entsprechendem Volumen PBS aufgenommen. Für die Proteinlysate wurden transfizierte Zellen zunächst mit kaltem PBS gewaschen und wie unter 3.3.1 beschrieben in 600  $\mu$ l CHAPS-Puffer lysiert. Durch Zentrifugation (20.800 g, 30 min, 4 °C) wurden anschließend alle nichtlöslichen Bestandteile aus dem Lysat entfernt. Für die IP wurden 550  $\mu$ l des Überstandes mit 50  $\mu$ l M2-Flag-Beads über Nacht bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurden die M2-Flag-Beads 6 x mit je 600  $\mu$ l CHAPS-Puffer gewaschen (je 420 g, 1 min, 4 °C) und in 20  $\mu$ l Laemmli-Puffer aufgenommen. Nach einer Inkubation für 5 min bei 95 °C und einer Zentrifugation für 1 min bei 20.800 g wurde der Überstand mittels SDS-PAGE (3.3.4) aufgetrennt.

#### B. IP mit freien Antikörpern

Wie oben bereits beschrieben wurden transfizierte Zellen (3.1.3) in 600  $\mu$ l CHAPS-Puffer zunächst lysiert (3.3.1). Für die IP wurden 550  $\mu$ l des Lysats mit 4  $\mu$ g Antikörper über Nacht bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Zur Immobilisation der an die Antikörper gebundenen Proteine wurden 40  $\mu$ l Protein G Sepharose-Beads zugegeben und für weitere 2 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Protein G Sepharose-Beads wurden zuvor 3 x mit je 600  $\mu$ l CHAPS-Puffer gewaschen (je 420 g, 1 min, 4 °C). Nach der Inkubation wurden die Protein G Sepharose-Beads 6 x mit CHAPS-Puffer gewaschen (je 420 g, 1 min, 4 °C), in 20  $\mu$ l Laemmli-Puffer aufgenommen, bei 95 °C für 5 min aufgekocht und bei 20.800 g für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt (3.3.4).

### 3.3.9 Immunfluoreszenzfärbung (IF)

Am Vortag wurden 293-HEK-Zellen, die auf 25-Well-Kulturschalen ausplattiert worden waren, transfiziert (3.1.3). Alle nachfolgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Ungefähr 18 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4 % Formalin in PBS-Puffer für 15 min fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS 1 x gewaschen und mit 50 mM Ammoniumchlorid in PBS 10 min inkubiert, um das restliche Formalin zu inaktivieren. Es folgte zweimaliges Waschen mit PBS. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wurden die Zellen 10 min mit 0,1 % Triton in PBS inkubiert. Anschließend wurde das Triton durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Vor der Antikörperinkubation wurden alle unspezifischen Bindestellen durch

30 minütiges Blocken mit 0,2 % Fishskin-Gelatine in PBS abgesättigt. Der Primärantikörper wurde 1:400 in Blockpuffer verdünnt und die Zellen damit für 1 h inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde danach durch dreimaliges Waschen für je 3 min mit Blockpuffer entfernt. Der Sekundärantikörper wurde 1:1000 in Blockpuffer verdünnt und die Zellen damit für 1 h inkubiert. Danach wurden die Zellen nochmals 8 x gewaschen (je 5 min) und schließlich mit Mounting Medium eingedeckelt.

### 3.3.10 In vitro Transkription/Translation von Proteinen

Die *in vitro* Transkription/Translation wurde mit Hilfe des Retikulozytenlysat (Kaninchen) gekoppelten TNT-Systems von Promega durchgeführt. Alle Proteine wurden durch [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert.

Ein Ansatz (insg. 50  $\mu$ l) für eine Transkription/Translation setzt sich folgendermaßen zusammen:

DNA	1,5 µl (1 µg/µl)
H <sub>2</sub> O (DEPC-behandelt)	14,5 µl
RNAsin	1 µI
Aminosäuremix (ohne Methionin)	1 µI
25 x Puffer	2 µl
Retikulozytenlysat	25 µl
T7 RNA-Polymerase	1 µI
[ <sup>35</sup> S]-Methionin	4 µl (10 µCi/µl)

Der Ansatz wurde für 1 h 30 min bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl wie auch eine 1:10 Verdünnung des Ansatzes mittels SDS-PAGE (3.3.4) analysiert. Die radioaktivmarkierten Proteine wurden für den GST-Pull-Down (3.3.12) verwendet.

### 3.3.11 Herstellung von GST-Fusionsproteinen

Zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen wurde der *E. coli* Stamm BL21 DE3 verwendet. Zur Fusionierung des gewünschten Proteins mit dem GST-Tag wurde der Vektor pGEX-6-P1 verwendet.

Die *E. coli* Bakterien wurden am Vortag mit dem entsprechenden Vektorkonstrukt transformiert (3.2.2) und in 50 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Für die Expressionskultur wurden 300 ml LB-Medium mit 10-20 ml dieser Vorkultur angeimpft und auf eine  $OD_{600}$  von 0,6 bei 37 °C eingestellt.

Anschließend wurde die Produktion der GST-Fusionsproteine durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur für 3 h bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Zur Kontrolle des Verlaufs der Expression wurde jede Stunde 1 ml entnommen, zentrifugiert (20.800 g, 1 min, 4 °C) und mit Laemmli-Puffer lysiert (3.3.2). Die Laemmli-Lysate wurden mittels SDS-PAGE und eine anschließende Coomassie-Brillantblaufärbung analysiert (3.3.5). Nach Beendigung der IPTG-Inkubation wurden die Bakterien abzentrifugiert (5000 rpm, 30 min, 4 °C), in 20 ml kaltem PBS resuspendiert und über Nacht bei – 20°C eingefroren. Zur Lyse der Bakterien wurden diese auf Eis wieder aufgetaut und sonifiziert (Sonificator (Heinemann): Zyklus 4, Intensität 3, 2 x 10 min). Zum Aufschluss von bakteriellen Einschlusskörpern wurde das Bakterienlysat mit 2 ml Triton (10 %) für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Entfernung der Zelltrümmer wurde das Lysat danach bei 23.420 g und 4 °C für 45 min zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei – 80 °C gelagert.

#### 3.3.12 GST-Pull-Down

Der GST-Pull-Down ist eine Methode zur Analyse von Proteininteraktionen *in vitro*. Dabei werden <u>G</u>lutathion-<u>S</u>-<u>T</u>ransferase (GST) gekoppelte Proteine an einer Glutathion-Sepharose-Matrix immobilisiert und somit als Fängermoleküle für radioaktiv markierte Proteine (3.3.10) eingesetzt. Die Glutathion Sepharose<sup>™</sup> 4B Beads von GE Healthcare wurden nach Angaben des Herstellers für den GST-Pull-Down vorbereitet. Zur Verringerung unspezifischer Bindungen an GST alleine, wurde zunächst ein *"Preclearing*" durchgeführt.

Für das *"Preclearing*" der Tanslatate wurden 50 µl Glutathion-Sepharose-Beads mit 50 µl GST-Lysat und 150 µl PBS-T 5 min bei RT inkubiert und anschließend 3 x mit PBS-T gewaschen (je 420 g, 1 min, 4 °C). Danach wurden sie mit 120 µl Puffer A und 10-20 µl Translatat für 1 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Die Glutathion-Sepharose-Beads wurden dann durch Zentrifugation entfernt (420 g, 1 min, 4 °C) und der Überstand in den GST-Pull-Down eingesetzt.

Für den GST-Pull-Down wurden zunächst die Glutathion-Sepharose-Beads mit dem GST-Fusionsprotein (3.3.11) beschichtet. Hierfür wurden 20  $\mu$ l Glutathion-Sepharose-Beads mit dem jeweiligen GST-Fusionsprotein für 5 min bei RT inkubiert und anschließend 3 x mit PBS gewaschen (je 420 g, 1 min, 4 °C). Als Kontrolle

41

wurden Glutathion-Sepharose-Beads nur mit GST beschichtet. Die auf Proteinmenge angeglichenen Volumina an GST-Proteinen sind in Tabelle 3.3 angegeben.

GST-Fusionsprotein	Volumen
GST	5 µl
GST-SHARP (3477-3664)	10 µl
GST-SHARP (3477-3628)	20 µl
GST-RBP-Jκ	20 µl
GST-ETO	100 µl
GST-AML1/ETO	100 µl

Tab. 3.3: Volumenangaben zu GST-Fusionsproteinen

Die beschichteten Glutathion-Sepharose-Beads wurden mit dem Überstand aus dem *"Preclearing"* vermischt und 1 h bei 4 °C im Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden sie 4 x mit je 600 µl Puffer A und 4 x mit je 600 µl Puffer B gewaschen (je 420 g, 1 min, 4 °C). Nach Zugabe von 20 µl Laemmli-Puffer, einer Inkubation für 5 min bei 95 °C und einer Zentrifugation bei 20.800 g (1 min, 4 °C) wurde der Übertand mittels SDS-PAGE (3.3.4) aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mit 5 % Methanol und 7 % Essigsäure fixiert und getrocknet. Die Exposition erfolgte mit einem Kodak BioMax MR Film bei RT.

# 3.3.13 Aufreinigung von DNA-bindenden RBP-Jκ-Komplexen über DNA-Affinitätschromatographie

#### A. Vorbereitung des DNA-Fragments

Um ein DNA-Fragment zu erhalten, das mehrere RBP-J $\kappa$ -Bindestellen enthält wurden je 160 µg (160 µl) des Vektors pGA981/6 mit 10 µl (10 U/µl) Nsi I, 5 µl (10 U/µL) Hind III, 20 µl Puffer und 5 µl H<sub>2</sub>O für 3 h bei 37 °C in insgesamt 3 Ansätzen verdaut. Die resultierenden DNA-Fragmente wurden über Gelelektrophorese aufgereinigt (3.2.10) und in je 80 µl demin. H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Fraktionen wurden vereinigt, mit 24 µl Na-Acetat und 660 µl 100 % EtOH versetzt und bei – 80 C über Nacht gefällt. Anschließend wurde die DNA zentrifugiert (20.800 g, 30 min, 4 °C), das Pellet mit 70 % kaltem EtOH gewaschen (20.800 g, 30 min, 4 °C) und in 50 µl TE aufgenommen.

# **B. Biotinylierung des DNA-Fragments**

Folgender Ansatz wurde für die Biotinylierung verwendet (insg. 90 µl):

DNA-Fragment	25 µl
1 mM dGTP	12 µl
1 mM dTTP	12 µl
1 mM dCTP	12 µl
biotinyliertes dATP (50 nM)	6 µl
Puffer 2 (New England Biolabs)	9 µl
Klenow	4 µl (5 U/µl)
H <sub>2</sub> O	10 µl

Die DNA wurde anschließend auf Nick<sup>™</sup> Columns G50 aufgetragen und in 1ml TE equilibriert, wobei jeweils nur 2 Tropfen in einem Eppendorfgefäß aufgefangen wurden. Zur Überprüfung der Biotinylierung wurde jeweils 1 µl der Fraktionen auf eine Nitrocellulosemembran gespottet und mittels des ECL<sup>™</sup> Streptavidin-HRP conjugate Kits nach Angaben des Herstellers GE Healthcare überprüft. Die positiven Fraktionen wurden vereinigt und weiter verwendet.

#### C. Bindung des DNA-Fragments an Streptavidin-Sepharose Säule

Die Streptavidin-Sepharose Säule wurde zuerst 2 x mit PBS gewaschen (181 g, 1 min, 4 °C). Die fertige Säule wurde mit der biotinylierten DNA und 5 ml PBS für 1 h bei 4 °C inkubiert und anschließend 3 x mit 8 ml PBS gewaschen.

### D. Aufreinigung von RBP-J $\kappa$ -Proteinkomplexen

Aus jeweils  $10^9$  Kasumi- bzw. HEL-Zellen wurden CHAPS-Lysate hergestellt (3.3.1). Hierfür wurden 10 ml CHAPS-Puffer verwendet. Nach der Zentrifugation (20.800 g, 30 min, 4 °C) wurden die Überstände zusätzlich mit 0,45 µm Filtern gereinigt und für ein *"Preclearing*" mit einer leeren Streptavidin-Sepharose-Säule für 1 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurde das Lysat mit der oben beschriebenen vorbereiteten Streptavidin-Sepharose-Säule 3 h bei 4 °C inkubiert und die Säule 3 x mit 5 ml CHAPS-Puffer gewaschen (181 g, 1 min, 4 °C). Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit je 1ml CHAPS-Puffer, denen steigende Konzentrationen NaCl zugesetzt wurden (150 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, 1000 mM NaCl). Die Fraktionen wurden bei – 80 °C gelagert und für Gelretardationsexperimente (3.3.14) und SDS-PAGE-Analysen (3.3.4) herangezogen.

#### 3.3.14 Gelretardation (EMSA)

Zur Analyse von DNA-Protein-Interaktionen eignen sich Gelretardationsexperimente, kurz EMSA ("*Electromobility Shift Assay*"). Die Methode basiert darauf, dass DNA, an der Proteinkomplexe gebunden vorliegen, eine wesentlich langsamere Wandergeschwindigkeit in einem nativen Gel zeigt als freie DNA. Das hier verwendete doppelsträngige Oligonukleotid LMP (5'-CCT GGA ACT ATT TTC CCA CGG TGC CCT TCC GCC CAT TTT CCC ACG AGT CG-3') enthält zwei RBP-J $\kappa$ Bindestellen die denen des EBV-TP-1-Promotors entsprechen.

Es wurde ein 5 % Polyacrylamidgel verwendet. Um die Polymerisation von 50 ml Gel zu starten, wurden 130  $\mu$ l 10 % APS und 130  $\mu$ l TEMED zugegeben. Das Gel wurde vor dem Probenauftrag bei 33 mA und 100 V für 30 min mit Elektrophoreselaufpuffer vorelektrophoresiert. Die Oligonukleotide (LMP) wurden zuvor mit  $\alpha$ d-ATP\* ([<sup>32</sup>P], 10  $\mu$ Ci/ $\mu$ I)) unter Verwendung des Klenow-Fragments radioaktiv markiert. Als Proteinextrakt wurde ein Aliquot der RBP-J $\kappa$  Aufreinigung (3.3.13) verwendet. Für die Bindereaktion wurde folgender Ansatz verwendet:

10 x Bindepuffer	2 µl
32P-kinasiertes Oligonukleotid	100.000 cpm
Poly-dldC	1 µl (0,5 µg/µl)
Proteinextrakt	5 µl
dd H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Vor der Zugabe des radioaktiv markierten Oligonukleotids wurde die Reaktion für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe des Oligonukleotids erfolgte eine weitere Inkubation für 15 min bei RT. Nach der Bindereaktion wurden die Proben mit 4  $\mu$ l Ladepuffer versetzt und vollständig aufgetragen. Ein Gel wurde bei 30 mA und 120 V für ca. 2 h laufen gelassen. Nach der Auftrennung wurde das Gel bei 75 °C für 1 h getrocknet. Die Exposition erfolgte in einer Filmkassette mit Verstärkerfolie bei - 80 °C.

#### 3.3.15 Luciferase-Experimente

Am Vortag wurden HeLa-Zellen transfiziert (3.1.4) und für 18-24 h bei 37 °C und 5 % inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und zur Lyse in 200  $\mu$ l Zelllyse-Reagenz von Promega 1 h bei – 20 °C eingefroren. Um alle nicht

löslichen Zellbestandteile zu entfernen, folgte eine Zentrifugation bei 20.800 g für 4 min. Vom Überstand wurden 5-20 µl mit 50 µl Luciferase-Substrat vermischt. Die Messung erfolgte am Luminometer (Lumineszenzgerät Lumat LB 9501). Die Messdauer betrug zwischen 2 und 10 sek. Für die Auswertung wurden die Messergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten verwendet.

### 4. Ergebnisse

# 4.1 Identifizierung von ETO und AML1/ETO als neue Interaktionspartner der Repressionsdomäne von SHARP

Das Yeast-Two-Hybrid-System ist eine bewährte Methode zur Untersuchung neuer Protein-Protein-Interaktionen in vivo (38, 102, 103). Mit Hilfe eines solchen Verfahrens wurde bereits SHARP als Interaktionspartner von RBP-J $\kappa$  identifiziert (132). In Vorarbeiten wurde für die Identifizierung von SHARP-interagierenden Proteinen in weiteren Yeast-Two-Hybrid-Experimenten eine "Bait-Bank" bestehend aus sieben überlappenden pGBT9-Konstrukten von SHARP erstellt. Über die SHARP-Repressionsdomäne (RD) konnte dabei innerhalb einer humanen embryonalen Gehirnbibliothek eine cDNA identifiziert, deren Translationsprodukt spezifisch mit der SHARP Repressionsdomäne interagierte. Eine Seguenzierung des Two-Hybrid-Klons ergab, dass es sich um den C-terminalen Teil von ETO handelte (Abb. 4.1). Der Vergleich des Klons mit dem vollständigen ETO-Protein zeigt, dass diesem, der N-Terminus bis einschließlich Aminosäure 263 und somit auch die erste funktionelle Domäne von ETO fehlt (Abb. 4.1). Das vollständige ETO wurde von J. Lausen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Für nachfolgende Experimente wurde die DNA-Sequenz von ETO in die Vektoren pcDNA3, pcDNA3-Flag3 und pGEX-6-P1 kloniert (3.2).



ETO: Two Hybrid Klon

**Abb. 4.1: Vergleich des Two-Hybrid-Klons von ETO mit dem vollständigen Protein.** Der Two-Hybrid-Klon stellt den C-terminalen Teil ab Aminosäure 263 des vollständigen ETO-Proteins dar. Er beinhaltet die Nervy homologen Regionen NHR2 bis NHR4. Die Zahlen geben den Aminosäurebereich der jeweiligen Domäne an.

Da ETO fast vollständig im Fusionsprotein AML1/ETO vertreten ist, wurde auch dieses Protein für weitere Untersuchungen mit einbezogen. AML1/ETO wurde als pGEX-6-P1-AML1/ETO Konstrukt ebenfalls von J. Lausen zur Verfügung gestellt und für weitere Experimente in pcDNA3 und pcDNA3-Flag3 umkloniert.

# 4.1.1 ETO und AML1/ETO interagieren mit der Repressionsdomäne (RD) von SHARP *in vitro* und *in vivo*

Zur Bestätigung einer direkten Interaktion zwischen der SHARP-RD und ETO bzw. AML1/ETO wurden zunächst GST-Pull-Down Experimente (3.3.12) durchgeführt. In diesen *in vitro*-Experimenten macht man sich die hohe Bindungsaffinität der <u>G</u>lutathion-<u>S</u>-<u>T</u>ransferase, kurz GST, zu Glutathion zunutze. Im Experiment wird ein Interaktionspartner mit dem GST-Tag versehen (3.3.11) und an Glutathion-beschichtete Sepharose-Kügelchen (*"Beads"*) als Fänger (*"Bait"*) immobilisiert. Der andere Interaktionspartner wird *in vitro* in einem zellfreien System hergestellt und über [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert. Hierfür wurde das Retikulozytenlysat gekoppelte TNT-System von Promega (3.3.10) verwendet. Als Negativkontrolle dienen in allen Versuchen Glutathion-Sepharose-Beads, die nur mit GST allein gekoppelt sind.

Als Fänger wurde zum einen die SHARP-RD (3477-3664) eingesetzt. Des Weiteren wurde eine verkürzte Variante der RD, SHARP-RD (3477-3628), verwendet. Beide Varianten der RD wurden N-terminal mit dem GST-Tag fusioniert und an Glutathion-Sepharose-Beads gekoppelt. ETO und AML1/ETO wurden translatiert und radioaktiv markiert (3.3.10).

Aus den Experimenten geht deutlich hervor, dass sowohl ETO als auch AML1/ETO nur mit der vollständigen SHARP-RD (3477-3664) interagieren (Abb. 4.2 A und B, Reihe 4). In beiden Fällen konnte keine Interaktion mit der verkürzten SHARP-RD (3477-3628) festgestellt werden (Abb. 4.2 A und B, Reihe 3). Ebenfalls fand keine Interaktion mit GST allein statt (Abb. 4.2 A und B, Reihe 2).

47



Abb. 4.2: GST-Pull-Down zur Kontrolle der Interaktion von SHARP-RD mit ETO (A) bzw. AML1/ETO (B) *in vitro*. Glutathion-Sepharose-Beads wurden entweder mit GST, GST-SHARP-RD (3477-3628) oder GST-SHARP-RD (3477-3664) beschichtet. ETO und AML1/ETO wurden *in vitro* translatiert und radioaktiv markiert. (A) und (B) zeigen, dass ETO und AML1/ETO nur an GST-SHARP-RD (3477-3664) bindet (Reihe 4). GST alleine oder GST-SHARP-RD (3477-3628) interagieren weder mit ETO noch mit AML1/ETO (Reihe 2 und 3).

Um zu überprüfen, ob SHARP über die RD mit ETO bzw. AML1/ETO auch *in vivo* interagiert, wurden Immunpräzipitations-(IP)-Experimente durchgeführt.

Hierfür wurde die SHARP-RD N-terminal mit einem Flag-Tag versehen. Der Flag-Tag ermöglicht es, SHARP an M2-Flag-Beads, die mit einem anti-Flag Antikörper beschichtet sind, zu koppeln und zusammen mit anderen gebundenen Proteinen zu präzipitieren. Zur Kontrolle wurden 293-HEK-Zellen nur mit 15 µg pcDNA3-ETO bzw. oder 10 pcDNA3-Flag1-SHARP-RD pcDNA3-AML1/ETO über die μg CaCl<sub>2</sub>/Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-Methode transfiziert (3.1.3). Für die eigentliche IP wurden die Zellen mit pcDNA3-Flag1-SHARP-RD zusammen mit pcDNA3-ETO bzw. pcDNA3-AML1/ETO kotransfiziert (3.1.3). Ungefähr 24 h nach der Transfektion wurden Gesamtzellproteinextrakte hergestellt (3.3.1) und die Präzipitation mit den antikörperbeschichteten M2-Flag-Beads durchgeführt (3.3.8, A). Anschließend erfolgte eine Analyse der Proteinlysate vor und nach der IP über SDS-PAGE (3.3.4) und Western-Blot (3.3.6/7).

Wie in Abbildung 4.3 zu sehen, werden alle Proteine in den Zellen exprimiert (Abb. 4.3, oberer und mittlerer Blot). Nur bei einer Kotransfektion der Plasmidkonstrukte für SHARP-RD und ETO bzw. AML1/ETO erhält man eine Kopräzipitation von ETO und AML1/ETO mit der SHARP-RD (Abb. 4.3, unterer Blot, Reihe 4 und 5). Zusätzlich kann gezeigt werden, dass nicht transfizierte 293-HEK-Zellen weder endogenes ETO noch AML1/ETO enthalten (Abb. 4.3, Reihe 6). Zusammengefasst konnte in diesen

48

Experimenten die Interaktion zwischen ETO bzw. AML1/ETO und SHARP sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestätigt werden.



Abb. 4.3: IP zu Bestätigung der Interaktion von SHARP mit ETO und AML1/ETO in vivo. 293-HEK-Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid für Flag1-SHARP-RD (10 µg) zusammen mit Konstrukten für ETO (15 µg) oder AML1/ETO (15 µg) kotransfiziert. Als Kontrolle erfolgten Einzeltransfektionen der Konstrukte. Für die IP wurden mit anti-Flag Antikörper beschichtete Agarose-Beads verwendet. Die Expression von Flag1-SHARP-RD wurde mit einem anti-Flag Antikörper kontrolliert (oberer Blot). Für die Detektion von ETO und AML1/ETO wurde ein anti-ETO Antikörper verwendet (mittlerer und unterer Blot). Sowohl ETO als auch AML1/ETO können nur kopräzipitiert werden, wenn sie zusammen mit Flag1-SHARP-RD exprimiert wurden. IP: Immunpräzipitation; WB: Western-Blot.

# 4.1.2 Die endogenen ETO und AML1/ETO Proteine interagieren mit SHARP in HEL- und Kasumi-Zellen

Obwohl durch die IPs gezeigt werden konnte, dass SHARP mit ETO und mit AML1/ETO auch in vivo interagiert, so muss bei diesen Experimenten berücksichtigt werden, dass alle beteiligten Interaktionspartner überexprimiert wurden. Um nun zu beweisen, dass es sich hierbei nicht nur um eine durch die Überexpression herbeigeführte Interaktion handelt, wurde im Folgenden untersucht, ob auch endogen auftretendes ETO bzw. AML1/ETO mit endogenem SHARP interagiert. Zu diesem Zweck wurden IPs mit ETO bzw. AML1/ETO exprimierenden Zelllinien durchgeführt. In Bezug auf ETO wurden HEL-Zellen verwendet (34). Hierbei handelt es sich um humane Erythrozytenvorläuferzellen. Für AML1/ETO wurden Kasumi-Zellen verwendet (34). Bei diesen Zellen handelt es sich um myeloide Vorläuferzellen, die ursprünglich aus einem Patienten gewonnen wurden, der die t(8;21) Translokation trug. Über Northern-Blot Analysen konnten hohe

Konzentrationen an SHARP in Gehirn, Hoden, Milz und Thymus sowie geringere Konzentrationen in Nieren, Leber, Milchdrüsen und in der Haut gefunden werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass SHARP in den Tumorzelllinien 293-HEK, HeLa, MCF-1 und HepG2 exprimiert wird (155). Aufgrund dieses breiten Expressionmusters wurde davon ausgegangen, dass auch die hier verwendeten Zelllinien HEL und Kasumi SHARP exprimieren. Da SHARP mit RBP-J $\kappa$  interagiert (132), wurde zusätzlich untersucht, ob auch RBP-J $\kappa$  kopräzipitiert werden kann.



Abb. 4.4: Kopräzipitation von endogen exprimiertem ETO (A) bzw. AML1/ETO (B) mit einem anti-SHARP Antikörper. Gesamtzellextrakte aus HEL- (A) und Kasumi-Zellen (B) wurden über Nacht mit 20 µl anti-SHARP Antikörper inkubiert. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden auf Protein G Sepharose Beads immobilisiert. Die Analyse der Gesamtzellextrakte und der IP erfolgte im Western-Blot mit einem anti-RBP-J $\kappa$  (A und B, Reihe 1 und 3) bzw. einem anti-ETO Antikörper (A und B, Reihe 2 und 4). Beide Zelllinien exprimieren RBP-J $\kappa$  (A und B, Reihe 1) und ETO bzw. AML1/ETO (A und B, Reihe 2). Sowohl aus HEL- wie auch aus Kasumi-Zellen können mit Hilfe von endogenem SHARP ETO, AML1/ETO (A und B, Reihe 4) und RBP-J $\kappa$  (A und B, Reihe 3) kopräzipitiert werden. IP: Immunpräzipitation.

Die IP wurde entsprechend 3.3.8 Abschnitt B durchgeführt. Für die Präzipitation wurden 20  $\mu$ l (ca. 4  $\mu$ g) eines gegen den N-Terminus von SHARP gerichteten Antikörpers verwendet (132). Eine anschließende Western-Blot Analyse der Gesamtzellextrakte mit einem anti-ETO Antikörper ergab, dass ETO in HEL-Zellen und AML1/ETO in Kasumi-Zellen nachweisbar ist (Abb. 4.4 A und B, Reihe 2). Des Weiteren kann mit einem anti-RBP-J $\kappa$  Antikörper bei beiden Zelllinien auch endogenes RBP-J $\kappa$  im Proteinlysat detektiert werden (Abb. 4.4 A und B, Reihe 1). Aufgrund einer Größe von ca. 450 kDa war es nicht möglich, SHARP im Western-Blot nachzuweisen. Dass SHARP dennoch in den Zellen exprimiert wird, zeigen die Analysen der IPs. Sowohl ETO als auch AML1/ETO können eindeutig mit Hilfe des anti-SHARP Antikörpers präzipitiert werden (Abb. 4.4 A und B, Reihe 4). Eine weitere Bestätigung für das Vorhandensein von SHARP zeigt die Kopräzipitation von RBP-J $\kappa$  in beiden Fällen (Abb. 4.4 A und B, Reihe 3).

# 4.1.3 Die Interaktion von ETO mit SHARP-RD erfolgt über die ersten beiden funktionellen Domänen (NHR1 und 2) von ETO

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass SHARP über seine Repressionsdomäne mit ETO bzw. AML1/ETO interagiert. Wie sich in GST-Pull-Down-Experimenten herausstellte, kam es nur dann zu einer Interaktion, wenn die RD vollständig repräsentiert war. Eine nur um wenige Aminosäuren verkürzte Variante der RD, ging keine Bindung mehr zu ETO oder AML1/ETO ein (4.1.1). Der Two-Hybrid-Klon von ETO (Abb. 4.1) gibt erste Anhaltspunkte, dass zumindest eine oder mehrere der letzten drei funktionellen Domänen von ETO für die Interaktion mit SHARP verantwortlich sind. Um genauer eingrenzen zu können, welche der funktionellen Domänen an der Bindung zur SHARP-RD beteiligt sind, wurden mittels PCR (3.2.6, A) mehrere Deletionsmutanten von ETO hergestellt (Abb. 4.5, A) und im GST-Pull-Down (3.3.12) überprüft. Die für die PCR verwendeten Oligonukleotidpaare sind unter 2.9.1 aufgeführt.

Bei der ersten ETO-Mutante, ETO-N, handelt es sich um eine C-terminale Deletion ab Aminosäure 306. Sie umfasst nur die erste funktionelle Domäne NHR1. Die zweite Mutante wurde als ETO-C bezeichnet. Sie entspricht einer um 34 Aminosäuren kürzeren Version des Two-Hybrid-Klons. ETO (297/401) umfasst nur NHR2. Die Deletionsmutante ETO (400/604) repräsentiert den C-Terminus von ETO und umfasst die Domänen NHR3 und NHR4. Alle Deletionsmutanten wurden Nterminal mit einem Flag-Tag fusioniert. Für den GST-Pull-Down wurden alle drei Mutanten *in vitro* translatiert und mit [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert (3.3.10). Als Positivkontrolle wurde das vollständige ETO verwendet. Als Fänger wurden GST allein, GST-SHARP-RD (3477-3628) und GST-SHARP-RD (3477-3664) eingesetzt. Wie in Abbildung 4.5 B (Reihe 5 und 8) zu sehen, binden sowohl Flag3-ETO-N als auch Flag3-ETO-C an GST-SHARP-RD (3477-3664). In beiden Fällen konnte keine Interaktion mit der verkürzten SHARP-RD (3477-3628), festgestellt werden (Abb. 4.5 B, Reihe 4 und 7). Dasselbe gilt für die Deletionsmutante Flag3-ETO (297/401) (Abb. 4,5 D). Flag3-ETO (400/604) bindet weder an SHARP-RD (3477-3628) noch an SHARP-RD (3477-3664) (Abb. 4.5 C, Reihe 4 und 5). Es fand in allen Fällen keine Bindung an GST allein statt (Abb. 4.5 B, Reihe 3 und 6; Abb. 5 C, Reihe 3).



Abb. 4.5: Charakterisierung der Bindung von ETO an die SHARP-RD im GST-Pull-Down. (A) Schematische Darstellung der ETO-Deletionsmutanten und von AML1/ETO(tr). Die Länge von AML1/ETO(tr) beträgt insgesamt 556 Aminosäuren. Dabei entsprechen 552 Aminosäuren der Aminosäuresequenz des vollständigen Fusionsproteins, 4 weitere Aminosäuren (roter Bereich) werden durch eine C-terminale Modifikation der Originalsequenz angehängt. (B)-(E) GST-Pull-Down mit ETO-Deletionsmutanten. GST allein, GST-SHARP-RD (3477-3628) oder GST-SHARP-RD (3477-3664) wurden auf Glutathion-Sepharose-Beads immobilisiert und mit den in vitro translatierten, radioaktiv markierten ETO-Deletionsmutanten bzw. der C-terminal trunkierten AML1/ETO Version, Flag3-AML1/ETO(tr), inkubiert. Als Positivkontrolle wurde das Volllänge ETO eingesetzt. (B) und (D) Flag3-ETO-N, Flag3-ETO-C und Flag3-ETO (297/401) binden nur an GST-SHARP-RD (3477-3664) (B, Reihe 5 und 8; D, Reihe 4). Es kommt zu keiner Interaktion mit GST allein und GST-SHARP-RD (3477-3628) (B, Reihe 3 und 4; D, Reihe 2 und 3). (C) Flag3-ETO (400/604) ist nicht in der Lage an eines der GST-Proteine zu binden (Reihe 3-5). (E) Flag3-AML1/ETO(tr) bindet nur an GST-SHARP-RD (3477-3664). GST allein oder GST-SHARP-RD (3477-3628) sind nicht in der Lage eine Bindung einzugehen (Reihe 2 und 3). A/E: AML1/ETO.

Es wurde ebenfalls eine C-terminal deletierte Variante von AML1/ETO. AML1/ETO(tr), untersucht (Abb. 4.5 A). AML1/ETO(tr) ist das Ergebnis einer Baseninsertion, durch die es zu einer Verschiebung des Leserahmens kommt, was ein vorzeitiges Stop-Codon zur Folge hat. Dadurch fehlen dem ETO-Anteil dieser Deletionsmutante NHR3 und NHR4 (186). Zusätzlich werden die letzten 4 Aminosäuren des Proteins verändert (Abb. 4.5 A). Die Expression dieser AML1/ETO-Mutante führt im Mausmodell zu einem wesentlich schnelleren Ausbruch einer Leukämie als bei Mäusen, die das vollständige AML1/ETO exprimieren. Mit Hilfe eines Oligonukleotidpaares (2.9.3) wurde der C-Terminus von AML1/ETO entsprechend Yan et al. (2004) vor NHR3 entfernt und modifiziert (186). Hierfür wurde das Oligonukleotidpaar hybridisiert (3.2.7) und über eine interne BamH I Schnittstelle in der DNA-Sequenz von AML1/ETO und eine Xho I Schnittsstelle im Vektor in pcDNA3-Flag3-AML1/ETO kloniert. Da in einem weiteren Schritt AML1/ETO(tr) C-terminal mit eGFP fusioniert werden sollte (4.2.1), wurde keine TAG-Sequenz über das Oligonukleotidpaar eingeführt. Dies hatte zur Folge, dass über den Vektor pcDNA3 eine zusätzliche Basensequenz von 51 bp (entspricht 16 Aminosäuren) an AML1/ETO(tr) angehängt wird.

Wie in Abbildung 4.5 D zu sehen, bindet Flag3-AML1/ETO(tr) nur an die vollständige SHARP-RD (3477-3664) (Reihe 4).

Damit konnte gezeigt werden, dass nur die ersten beiden funktionellen Domänen, NHR1 und 2, für die Interaktion von ETO bzw. AML1/ETO mit der SHARP-RD verantwortlich sind.

# 4.2 Herstellung und intrazelluläre Lokalisation von eGFP-Fusionsproteinen von ETO, AML1/ETO und AML1/ETO(tr)

Für die Analyse der intrazellulären Lokalisation von ETO und AML1/ETO wurden eGFP-Fusionen der beiden Proteine hergestellt. Die trunkierte AML1/ETO-Version wurde ebenfalls mit eGFP fusioniert.

Für die Herstellung der eGFP-Fusionskonstrukte von ETO und AML1/ETO wurde zunächst über PCR (3.2.6, A) das Stop-Codon (TAG) von ETO und AML1/ETO entfernt. Die verwendeten Primer ETO-eGFP up und ETO-eGFP down sind unter 2.9.1 aufgeführt. Das entstandene PCR-Produkt wurde über die Schnittstellen *EcoR I* 

und *Xho I* in pcDNA3-eGFP (ohne ATG) kloniert. Anschließend wurde der N-Terminus von ETO bzw. AML1/ETO über die Schnittsstelle *EcoR I* wieder eingefügt.

Für die Herstellung von pcDNA3-Flag3-AML1/ETO(tr)-eGFP wurde eGFP (ohne ATG) über die Schnittstellen *Xho I* und *Xba I* C-terminal mit AML1/ETO(tr) fusioniert.

Die Expression der Fusionsproteine wurde in HeLa-Zellen überprüft. Die Zellen wurden mit je 2 µg der Fusionskonstrukte transfiziert (3.1.4). Zum Vergleich wurden die Zellen mit einem eGFPC1-Vektorkonstrukt (2 µg) transfiziert (3.1.4). Ungefähr 18 h nach der Transfektion erfolgte die Analyse der Zellen an einem Fluoreszenzmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung (Abb. 4.6 A).

Zusätzlich wurden 293-HEK-Zellen mit den Konstrukten der eGFP-Fusionen transfiziert (3.1.3). Zur Kontrolle wurden die Zellen mit Expressionsplasmiden für ETO, AML1/ETO und Flag3-AML1/ETO(tr) transfiziert (3.1.3). 24 h nach der Transfektion wurden Gesamtzellextrakte aus den Zellen hergestellt (3.3.2). Diese wurden im Western-Blot (3.3.6/7) überprüft.

Sowohl ETO-eGFP (Bild a) als auch AML1/ETO-eGFP (Bild b) sind, wie in Abbildung 4.6 A zu sehen, im Zellkern lokalisiert. Dieses Ergebnis entspricht bereits veröffentlichten Daten mit Saos2, HeLa und 293-HEK-Zellen (8, 108, 123). Die punktförmige Verteilung von ETO im Zellkern wurde bereits von Odaka et al. (2000) beschrieben (123). Auch die trunkierte Version von AML1/ETO (Bild c) lokalisiert im Zellkern. Dass die intrazelluläre Lokalisation von ETO, AML1/ETO und AML1/ETO(tr) nicht durch die Fusion mit eGFP beeinflusst wird, zeigen Kontrolltransfektionen mit eGFP allein. Freies eGFP ist gleichmäßig in der ganzen Zelle verteilt (Abb. 4.6 A, Bild d). In Western-Blot Analysen mit einem anti-GFP, einem anti-ETO und einem anti-Flag Antikörper konnte ebenfalls die Expression der Fusionsproteine in den Zellen bestätigt werden (Abb. 4.6 B).



Abb. 4.6: (A) Intrazelluläre Lokalisation von ETO-eGFP, AML1/ETO-eGFP und Flag3-AML1/ETO(tr)-eGFP. HeLa-Zellen wurden mit jeweils 2  $\mu$ g der ETO-eGFP, AML1/ETOeGFP und Flag3-AML1/ETO(tr)-eGFP Konstrukte transfiziert. EGFP allein diente als Kontrolle. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Analyse an einem Fluoreszenzmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung. ETO-eGFP (Bild a), AML1/ETOeGFP (Bild b) und Flag3-AML1/ETO(tr)-eGFP (Bild c) sind im Zellkern lokalisiert. EGFP (Bild d) ist gleichmäßig in der gesamten Zelle verteilt. (B) Western-Blot Analysen der eGFP-Fusionsproteine. 293-HEK-Zellen wurden mit jeweils 3  $\mu$ g der eGFP-Fusionskonstrukte transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Gesamtzellextrakte im Western-Blot mit einem anti-GFP (Reihe 1-3), einem anti-ETO (Reihe 4-7) und einem anti-Flag (Reihe 8 und 9) untersucht. A/E: AML1/ETO.

#### 4.3 Identifizierung endogener ETO- bzw. AML1/ETO-RBP-Jĸ-Proteinkomplexe

SHARP wurde als Teil eines von RBP-J $\kappa$  rekrutierten Proteinkomplexes identifiziert (132). Es stellte sich nun im nächsten Schritt die Frage, ob auch ETO bzw. AML1/ETO Teil von endogenen, an die DNA gebunden vorliegenden RBP-J $\kappa$ -Proteinkomplexen sind. Erste Anhaltspunkte auf die Existenz solcher Komplexe lieferten bereits IP-Experimente mit einem spezifischen anti-SHARP Antikörper in HEL- und Kasumi-Zellen (4.3.2). Für die Untersuchungen endogener ETO (AML1/ETO)-RBP-J $\kappa$ -Komplexe wurden wiederum HEL- und Kasumi-Zellen verwendet.

#### 4.3.1 Endogenes RBP-Jκ kopräzipitiert mit ETO

Für die Identifizierung von ETO-RBP-J $\kappa$ -Komplexen aus HEL-Zellen wurden zunächst IP-Experimente durchgeführt (3.3.8, B). Hierfür wurden 1 x 10<sup>8</sup> HEL-Zellen lysiert. Das Proteinlysat wurde über Nacht mit einem anti-ETO Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die an die Antikörper gebundenen Proteinkomplexe an Protein G Sepharose Beads gekoppelt und aufgereinigt. Die Auswertung der IP erfolgte über Western-Blot (3.3.6/7).



**Abb. 4.7: IP mit einem anti-ETO Antikörper aus HEL-Zellen**. Gesamtzellextrakte aus HEL-Zellen wurden über Nacht mit einem anti-ETO Antikörper inkubiert. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden anschließend an Protein G Sepharose Beads immobilisiert. Sowohl die Gesamtzellextrakte als auch die Präzipitationen wurden im Western-Blot mit Antikörpern gegen RBP-J<sub>K</sub> und ETO untersucht. In den Lysaten konnten RBP-J<sub>K</sub> (Reihe 1) und ETO (Reihe 2) nachgewiesen werden. RBP-J<sub>K</sub> kopräzipitiert mit ETO (Reihe 3). IP: Immunpräzipitation.

In den Gesamtzellextrakten können sowohl ETO als auch RBP-J $\kappa$  mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 4.7, Reihe 1 und 2). Des Weiteren kopräzipitiert RBP-J $\kappa$  mit ETO (Abb. 4.7, Reihe 3). Als Kontrolle der IP wurde anschließend der anti-RBP Antikörper von der PVDF-Membran entfernt (3.3.7) und die Membran mit dem anti-ETO Antikörper inkubiert (Abb. 4.7, Reihe 4). Sowohl der anti-ETO als der anti-RBP Antikörper erkennen zusätzlich die schwere und leichte Kette des für die IP verwendeten anti-ETO Antikörpers (Abb. 4.7, Reihe 3 und 4).

# 4.3.2 Endogenes ETO kopräzipitiert mit SHARP und RBP-J $\kappa$ an den Promotorregionen der Notch-Zielgene *HES1* und *Nrarp*

Ein weiterer Hinweis auf die Existenz von ETO-RBP-J $\kappa$ -Komplexen ergab sich aus <u>Ch</u>romatin<u>i</u>mmun<u>p</u>räzipitations (ChIP)-Experimenten, für die die ETO exprimierende Zelllinie MEL verwendet wurde (150). Die ChIP-Experimente und die anschließenden Analysen über die quantitative Real-Time-PCR wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. T. Borggrefe am MPI Freiburg durchgeführt. Die für die anschließende quantitative Real-Time-PCR verwendeten Primer sind unter 2.9.2 aufgeführt. Wie in Abbildung 4.8 zu sehen, kann ETO zusammen mit SHARP und RBP-J $\kappa$  an den Promotorregionen der Notch-Zielgene *HES1* und *Nrarp* nachgewiesen werden. Als Negativkontrollen wurden die 3'-Untranslatierten Regionen (UTRs) von HES1 und Hey1 verwendet.



**Abb. 4.8: ChIP-Experiment mit MEL-Zellen (murine Erythrozytenvorläuferzellen).** ETO kopräzipitiert mit SHARP und RBP-J $\kappa$  an den Promotoren der Notch-Zielgene *HES1* und *Nrarp*. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Auswertung gehen aus vier unabhängigen Experimenten hervor. UTR: Untranslatierte Region. (Durchgeführt in Zusammenarbeit mit Dr. T. Borggrefe, MPI Freiburg.) [Quelle: (150)]

#### 4.3.3 AML1/ETO ist Bestandteil endogener RBP-Jĸ-Komplexe in Kasumi-Zellen

Die AML1/ETO exprimierende Zelllinie Kasumi wurde für die Untersuchung von endogenen AML1/ETO-RBP-J $\kappa$ -Komplexen herangezogen. Zunächst wurden RBP-J $\kappa$ -Komplexe aus den Zellen über DNA-Affinitätschromatographie unter Ausnutzung der hohen Affinität von RBP-J $\kappa$  zu seiner DNA-Bindestelle aufgereinigt (3.3.13). Für

#### Ergebnisse

die Aufreinigung wurde ein biotinylisiertes, an eine Streptavidin-Säule gekoppeltes Oligonukleotid verwendet, das zwölf aufeinander folgende RBP-J $\kappa$ -Bindestellen beinhaltet. Die aufgereinigten RBP-J $\kappa$ -Komplexe wurden über Gelretardationsexperimente (EMSA, 3.3.14) auf ihre DNA-Bindeaktivität überprüft. Hierfür wurde ein [<sup>32</sup>P]-markiertes Oligonukleotid (LMP) verwendet, das zwei RBP-J $\kappa$ -Bindestellen besitzt. Zusätzlich erfolgte eine Analyse im Western-Blot (3.3.6/7) mit Antikörpern gegen RBP-J $\kappa$  und ETO. Für den Western-Blot wurden die Fraktionen der RBP-J $\kappa$ -Aufreinigung mit TCA gefällt und aufkonzentriert. Es wurden hier spezifische Antikörper gegen RBP-J $\kappa$  und ETO verwendet.



**Abb. 4.9: Aufreinigung von RBP-J** $\kappa$ **-Komplexen aus Kasumi-Zellen. (A)** Über DNA-Affinitätschromatographie wurden endogene RBP-J $\kappa$ -Proteinkomplexen aus Kasumi-Zellen aufgereinigt. Hierfür wurde ein DNA-Fragment eingesetzt, das 12 RBP-J $\kappa$ -Bindestellen enthält. Das Fragment wurde biotinylisiert und an eine Streptavidin-Säule gekoppelt. Die Säule wurde mit Gesamtzellextrakten aus Kasumi-Zellen für 3 h inkubiert. Danach wurde die Säule gewaschen und die RBP-J $\kappa$ -Komplexe mit steigenden Konzentrationen an NaCI eluiert. Die Gelretardation-Analyse der Fraktionen zeigt, dass Fraktion E2 (Reihe 7) die höchste Konzentration DNA-bindender RBP-J $\kappa$ -Komplexe (schwarzer Pfeil) enthält. **(B)** Western-Blot Analyse der Fraktionen der RBP-J $\kappa$ -Aufreinigung. Die Analyse der Fraktionen erfolgte mit einem anti-ETO Antikörper (oberer Blot), und einem anti- RBP-J $\kappa$  Antikörper (unterer Blot). AML1/ETO kann in den Fraktionen E2 und E3 nachgewiesen werden (oberer Blot, Reihe 4 und 5). RBP-J $\kappa$  kann im Lysat und in den Fraktionen E1-E4 detektiert werden (unterer Blot, Reihe 1-6). E: Elution; W: Waschschritt; WB: Western-Blot.

Im EMSA konnten anschließend DNA-bindende RBP-J $\kappa$ -Komplexe nachgewiesen werden. Die höchste Konzentration dieser Komplexen findet sich in Fraktion E2 (Abb. 4.9 A, Reihe 7). Auch in Fraktion E3 und E4 können noch geringere Konzentrationen an RBP-J $\kappa$ -Komplexen eluiert werden (Abb. 4.9 A, Reihe 8 und 9). Im Durchfluss bzw. in den Waschfraktionen findet sich nur ein sehr geringer Anteil an RBP-J $\kappa$  (Abb.

4.9 A, Reihe 2-5). Die Auswertung der Fraktionen im Western-Blot mit dem anti-RBP Antikörper zeigt dasselbe Ergebnis wie der EMSA (Abb. 4.9 B, unterer Blot). AML1/ETO kann mit Hilfe des anti-ETO Antikörpers sowohl in Fraktion E2 als auch in Fraktion E3 detektiert werden (Abb. 4.9 B, oberer Blot, Reihe 4 und 5). Für eine Detektion von AML1/ETO im Gesamtzellextrakt wurde zu wenig Protein aufgetragen. Dass AML1/ETO Teil von endogenen RBP-J $\kappa$ -Komplexen in Kasumi-Zellen ist, konnte durch IPs (3.3.8 B) mit dem anti-ETO Antikörper unterstützt werden. Western-Blot Analysen der Gesamtzellextrakte zeigen, dass RBP-J $\kappa$  und AML1/ETO in Kasumi-Zellen exprimiert wird (Abb. 4.10). Wie in Abbildung 4.10 zu sehen, kopräzipitiert RBP-J $\kappa$  mit AML1/ETO (Reihe 2 und 3).



Abb. 4.10: IP mit einem anti-ETO Antikörper aus Kasumi-Zellen. Gesamtzellextrakte aus Kasumi-Zellen wurden über Nacht mit einem anti-ETO Antikörper inkubiert. Die gebundenen Proteinkomplexe wurden anschließend an Protein G Sepharose Beads immobilisiert. Sowohl die Gesamtzellextrakte als auch die Präzipitationen wurden im Western-Blot mit Antikörpern gegen RBP-J $\kappa$  und ETO untersucht. In den Lysaten konnte RBP-J $\kappa$  (Reihe 1) nachgewiesen werden. RBP-J $\kappa$  kopräzipitiert mit AML1/ETO (Reihe 2). IP: Immunpräzipitation.

Zusammengenommen zeigen die Immunpräzipitationen und die Aufreinigung endogener RBP-J $\kappa$ -Komplexe mit ETO (AML1/ETO) exprimierenden Zellen, dass sowohl endogene RBP-J $\kappa$ /ETO-Komplexe als auch RBP-J $\kappa$ /AML1/ETO-Komplexe existieren.

### 4.4 Charakterisierung der Interaktion von ETO bzw. AML1/ETO mit RBP-J $\kappa$

SHARP interagiert mit RBP-J $\kappa$  und rekrutiert seinerseits weitere Korepressorproteine (132). Als Teil eines RBP-J $\kappa$ -SHARP-Komplexes konnte bereits das Heterodimer

CtIP/CtBP identifiziert werden (134). Die vorangegangen Experimente verifizierten zum einen die Interaktion zwischen SHARP und ETO bzw. AML1/ETO. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass AML1/ETO und ETO Teil DNA bindender endogener RBP-J $\kappa$ -Komplexe sind (4.3). Es soll nun der Frage nachgegangen werden, ob es auch eine direkte Bindung von ETO bzw. AML1/ETO zu RBP-J $\kappa$  gibt oder ob entsprechend des RBP-J $\kappa$ -SHARP-CtIP/CtBP-Komplexes SHARP als Verbindungsglied zwischen RBP-J $\kappa$  und ETO (AML1/ETO) fungiert.

### 4.4.1 ETO und AML1/ETO interagieren nicht direkt mit RBP-J $\kappa$

In GST-Pull-Down-Experimenten (3.3.12) wurde auf eine direkte Interaktion zwischen RBP-J $\kappa$  und ETO bzw. AML1/ETO getestet. ETO und AML1/ETO wurden *in vitro* translatiert und mit [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert (3.3.10). Anschließend wurden die Proteine zusammen mit an Glutathion-Sepharose-Beads gekoppelten GST, GST-RBP-J $\kappa$  oder GST-SHARP-RD inkubiert. ETO bindet nur an GST-SHARP-RD. Es konnte keine direkte Interaktion mit GST-RBP-J $\kappa$  festgestellt werden (Abb. 4.11 A, Reihe 3 und 4). Auch AML1/ETO zeigt nur eine sehr schwache Bindung an GST-RBP-J $\kappa$  im Vergleich zur Interaktion mit GST-SHARP-RD (Abb. 4.11 B, Reihe 3 und 4).



Abb. 4.11: GST-Pull-Down zur Untersuchung der Interaktion von ETO bzw. AML1/ETO mit RBP-J $\kappa$ . (A) und (B) Glutathion Sepharose Beads wurden mit GST allein, GST-RBP-J $\kappa$  oder GST-SHARP-RD beschichtet und mit *in vitro* translatiertem radioaktiv markiertem ETO oder AML1/ETO inkubiert. (A) ETO bindet nur an GST-SHARP-RD (Reihe 4), nicht an RBP-J $\kappa$  oder GST allein (Reihe 2 und 3). (B) AML1/ETO zeigt keine Bindung zu GST allein (Reihe 2), eine nur sehr schwache Bindung zu GST-RBP-J $\kappa$  (Reihe 3) und eine starke Bindung mit GST-SHARP-RD (Reihe 4).

Um herauszufinden, ob die schwache Interaktion von AML1/ETO mit RBP-J $\kappa$  auf die Runt-Domäne des AML1-Anteils des Fusionsproteins zurückzuführen ist, wurde derselbe Versuch mit der AML1-Runt-Domäne durchgeführt. Es konnte allerdings nur eine schwache Interaktion mit der GST-fusionierten SHARP-RD festgestellt werden (Abb. 4.12, Reihe 4).



Abb. 4.12: GST-Pull-Down zur Analyse der Interaktion von SHARP bzw. RBP-J $\kappa$  mit der AML1-Runt-Domäne. GST, GST- RBP-J $\kappa$  und GST-SHARP-RD wurden an Glutathion-Sepharose-Beads gekoppelt und mit zellfrei synthetisiertem, radioaktiv markiertem Flag3-AML1-Runt inkubiert. Flag3-AML1-Runt bindet schwach an GST-SHARP-RD (Reihe 4). Es findet keine Interaktion mit GST oder GST- RBP-J $\kappa$  statt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass weder AML1/ETO noch ETO direkt mit RBP-J $\kappa$  interagieren. Demnach muss SHARP als Verbindungsglied zwischen RBP-J $\kappa$  und ETO bzw. AML1/ETO fungieren.

#### 4.4.2 ETO bzw. AML1/ETO kolokalisieren mit SHARP und RBP-J $\kappa$ im Zellkern

Für Kolokalisationsexperimente wurden 293-HEK-Zellen mit jeweils 1-2  $\mu$ g der Expressionsplasmide für ETO-eGFP, AML1/ETO-eGFP, Flag3-AML1/ETO(tr)-eGFP und einer Fusion von RBP2N mit einer optimierten Variante des rot fluoreszierenden Proteins eqFP611 (178) kotransfiziert (3.1.3). Bei RBP2N handelt es sich um eine Spleißvariante von RBP-J $\kappa$ . Nach ca. 18 h wurden die Zellen fixiert. Anschließend wurde endogen exprimiertes SHARP mit dem anti-SHARP Primärantikörper und einem Alexa Fluor 647 konjugierten anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper gefärbt. Die Auswertung der IF (3.3.9) erfolgte zunächst an einem Fluoreszenzmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung (Abb. 4.13 A). ETO-eGFP (Bild A a), AML1/ETO-eGFP

(Bild A e) und Flag3-AML1/ETO(tr)-eGFP (Bild A i) kolokalisieren mit RBP2NeqFP611 (Bild A b, f, j) und SHARP (Bild A c, g, k) im Zellkern von 293-HEK-Zellen (Bild A d, i, n). Ausschnittvergrößerungen des Zellkerns zeigen dabei, dass es nur in bestimmten subnukleären Bereichen zu einer Kolokalisation aller drei Proteine kommt (Abb. 4.13 A, Bild e, j, o; schwarze Pfeile).



Abb. 4.13: Kolokalisation von eGFP-Fusionen von ETO, AML1/ETO oder Flag3-AML1/ETO(tr) mit RBP2N-eqFP611 und endogenem SHARP. (A) und (B) 293-HEK-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für ETO-eGFP, AML1/ETO-eGFP, Flag3-AML1/ETO(tr)-eGFP und RBP2N-eqFP611 kotransfiziert. Ungefähr 18 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit einem anti-SHARP Primärantikörper und einem Alexa Fluor 647 konjugiertem anti-Kaninchen IgG Antikörper gefärbt. (A) Analyse der IF an einem Fluoreszenzmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung. Die eGFP-Fusionsproteine (Bild a, f, k) kolokalisieren mit RBP2N-eqFP611 (Bild b, g, I) und endogenem SHARP (c, h, m) im Zellkern (Bild d, i, n). In Ausschnittsvergrößerungen (Bild e, j, o) ist zu erkennen, dass es in verschiedenen subnukleären Regionen zu einer Kolokalisation aller drei Proteine kommt (schwarze Pfeile). (B) Analyse der IF-Färbung von AML1/ETO-eGFP an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung. Stellvertretend für die Kolokalisationsexperimente mit ETO und AML1/ETO(tr) wurde die IF-Färbung für AML1/ETO zusätzlich an einem konfokalem Fluoreszenzmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung untersucht (Abb. 4.13 B). Diese Analyse verdeutlicht nochmals die Kolokalisation von AML1/ETO-eGFP, RBP2N-eq611 und SHARP im Zellkern (Abb. 4.13 B, a-d; e schwarze Pfeile).

# 4.5 Funktionelle Charakterisierung von ETO und AML1/ETO als SHARP interagierende Proteine

Ursprünglich wurde SHARP als Korepressor bei nicht ligandengebundenen, nukleären Rezeptoren identifiziert (155). Im Notch-Signaltransduktionsweg wurde SHARP ebenfalls als Korepressor für RBP-J $\kappa$  charakterisiert. SHARP spielt bei der Hemmung der Transkription des Notch-Zielgens *HES1* eine wichtige Rolle (132). In Verbindung mit dem Heterodimer CtIP/CtBP hemmt SHARP die Transkription von *Hey1* (132). Über die bisherige Funktion von ETO ist bekannt, dass es unter anderem als Korepressor für z.B. SMRT, NcoR oder Sin3A dient (101, 172). AML1/ETO konnte als Repressor AML1-abhängiger Gene identifiziert werden (138). Im nächsten Abschnitt soll zum einen der Frage nachgegangen werden, welche Funktion ETO und AML1/ETO in Verbindung mit RBP-J $\kappa$ /SHARP einnehmen. Zum anderen, ob die beiden Proteine an der Regulation von Notch-Zielgenen beteiligt sind.

# 4.5.1 Im Gegensatz zu AML1/ETO agiert ETO als HDAC-abhängiger Korepressor zu SHARP

Die Funktion von ETO und AML1/ETO als SHARP interagierende Proteine wurde in Luciferase-Experimenten ermittelt (3.3.15). Hierfür wurden HeLa-Zellen mit einer konstanten Menge des Reporterkonstrukts pFR-Luc (1 µg) zusammen mit den Expressionsplasmiden für G4-VP16 bzw. G4-VP16-SHARP-RD und steigenden Konzentrationen (100 ng, 200 ng) von ETO bzw. AML1/ETO kotransfiziert (3.1.4).

63



Abb. 4.14: Funktionelle Charakterisierung von ETO und AML1/ETO als SHARP interagierende Proteine. (A) Schematische Darstellung des Reporterkonstrukts pFR-Luc und des Funktionsprinzips des Transfektionsexperiments. (A) und (B) Funktionelle Analyse von ETO und AML1/ETO im SHARP-Repressions-Experiment. HeLa-Zellen wurden mit 1 µg des Reporters pFR-Luc, den Expressionsplasmiden für G4-VP16 bzw. G4-VP16-SHARP-RD und steigenden Konzentrationen (100 ng, 150 ng) ETO oder AML1/ETO kotransfiziert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Auswertung wurden aus mindestens vier unabhängigen Experimenten ermittelt (A) Im Gegensatz zu AML1/ETO führen steigende Konzentrationen an ETO zu einer Verstärkung der durch G4-VP16-SHARP-RD verursachten Hemmung. (B) Bestimmung der HDAC-Abhängigkeit der durch ETO und SHARP verursachten Hemmung. Die transfizierten Zellen wurden 6 h vor der Zellernte mit dem HDAC-Inhibitor TSA (100 nM) inkubiert. Nach Zugabe von TSA kann die Promotoraktivität wieder vollständig hergestellt werden. (D) Untersuchung der Interaktion von ETO bzw. AML1/ETO mit HDAC1 im GST-Pull-Down. Flag1-HDAC1 wurde in vitro translatiert und radioaktiv markiert. GST allein oder GST-Fusionen von ETO bzw. AML1/ETO wurden auf Glutathion-Sepharose-Beads immobilisiert und mit HDAC1 inkubiert. HDAC1 bindet sowohl GST-ETO (Reihe 3) als auch GST-AML1/ETO (Reihe 5). GST allein interagiert nicht mit HDAC1.
Der hier eingesetzte Reporter pFR-Luc besitzt 5 Kopien der GAL4-DNA-Bindesequenz. Die Aktivierung der Transkription des Luciferase-Gens erfolgt durch GAL4 in Fusion mit der VP16-Transaktivierungsdomäne des Herpes simplex Virus. Die Fusion von G4-VP16 mit der SHARP-RD erlaubt es ETO bzw. AML1/ETO die Aktivität des Reporters entsprechend zu beeinflussen (Abb. 4.14 A).

Eine zunehmende Überexpression von ETO verstärkt dosisabhängig die durch SHARP-RD vermittelte Hemmung der Promotoraktivität um über das 2-fache (Abb. 4.14 B). Überraschenderweise wurde bei einer Zugabe von AML1/ETO das Gegenteil erzielt. Hier steigt die Reporteraktivität auf ungefähr das Doppelte an (Abb. 4.14 B).

Vorangegangene Arbeiten bewiesen, dass sowohl ETO als auch SHARP mit Vertretern der HDAC-Familie interagieren (3, 155). Zudem wurde gezeigt, dass SHARP die Expression von HES1 HDAC-abhängig hemmt (132). In GST-Pull-Down Experimenten (3.3.12) konnte die Interaktion von ETO und HDAC1 nochmals verifiziert werden. Hierfür wurden ETO und auch AML1/ETO N-terminal mit dem GST-Tag fusioniert. Flag1-HDAC1 wurde *in vitro* translatiert und radioaktiv markiert (3.3.10). Wie in Abbildung 4.14 D zu sehen ist, interagiert HDAC1 sowohl mit GST-ETO (Reihe 3) als auch mit GST-AML1/ETO (Reihe 5).

Um zu ermitteln, ob die durch SHARP und ETO verursachte Repression HDACabhängig ist, wurden Transfektionsexperimente mit dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) durchgeführt (3.3.15). HeLa-Zellen wurden wiederum mit pFR-Luc, G4-VP16 bzw. G4-VP-SHARP-RD und ETO kotransfiziert (3.1.4). Die Zellen wurden 6 h vor der Zellernte mit TSA inkubiert.

Abbildung 4.14 B zeigt, dass TSA keinen Einfluss auf die Promotoraktivität hat, wenn diese zuvor mit G4-VP16 aktiviert wurde. Eine Überexpression der SHARP-RD bewirkt eine 3,5-fache Abnahme der Promotoraktivität. Die zusätzliche Expression von ETO verstärkt wiederum die SHARP-vermittelte Hemmung um das Doppelte. Durch die anschließende Zugabe von TSA kann die ursprüngliche Promotoraktivität wiederhergestellt werden. Zusammengenommen zeigen die funktionellen Analysen von ETO und AML1/ETO, dass nur ETO in der Lage ist, HDAC-abhängig als Korepressor zu SHARP zu agieren.

## 4.5.2 Im Gegensatz zu AML1/ETO hemmt ETO die Promotoraktivität der Notch-Zielgene *HES1* und *Hey1*

*HES1* und *Hey1* wurden als Notch-Zielgene identifiziert (104, 128). In Transfektionsexperimenten wurde der Einfluss von ETO und AML1/ETO auf die Transkription dieser Notch-Zielgene untersucht (3.3.15).

Als Reporterkonstrukte wurden zu diesem Zweck HES1-Luc und Hey1(-95/+87)-Luc eingesetzt. Bei diesen Konstrukten steht das Luciferase-Gen unter der Kontrolle des *HES1*- oder des *Hey1*-Promotors. Zur Aktivierung der Promotoraktivität kam eine Fusion von RBP mit der Transaktivierungsdomäne von VP16 zu Einsatz (RBP-VP16). HeLa-Zellen wurden mit den Reportern (0,5-1 µg), dem Expressionsplasmid für RBP-VP16 und steigenden Mengen (100 ng, 150 ng) ETO bzw. AML1/ETO kotransfiziert (3.1.4). Im Fall einer Hemmung der Promotoraktivität wurde durch Zugabe von TSA überprüft, ob diese HDAC-abhängig ist.



Abb. 4.15: Charakterisierung des Einflusses von ETO und AML1/ETO auf die RBP-VP16 abhängige Transkription der Notch-Zielgene *HES1* und *Hey1*. (A) und (B) HeLa-Zellen wurden mit den Reporterkonstrukten HES1-Luc (1  $\mu$ g) (A) bzw. Hey1(-95/+87)-Luc (1  $\mu$ g) (B), einem RBP-VP16-Konstrukt und steigenden Konzentrationen (50 ng, 100 ng) der Expressionsplasmide für ETO oder AML1/ETO kotransfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem HDAC-Inhibitor TSA (150 nM) 6 h vor der Zellernte inkubiert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Auswertung ergaben sich aus mindestens vier unabhängigen Experimenten. ETO hemmt dosisabhängig die Promotoraktivität von *HES1* (A) und Hey1 (B), die zuvor durch RBP-VP16 aktiviert wurde. TSA-Zugabe hebt die durch ETO verursachte Hemmung der *HES1*- (A) und *Hey1*-Promotoraktivität (B) vollständig wieder auf. AML1/ETO zeigt eine leicht aktivierende Wirkung auf *HES1* (A). Auf Hey1 (B) hat AML1/ETO dagegen keinen Einfluss.

Eine Überexpression von RBP-VP16 führt zu einer Erhöhung der *HES1*-Promotoraktivität um das 7-fache. Bei einer Kotransfektion von ETO kommt es zu einer dosisabhängigen ca. 3-fachen Abnahme der Promotoraktivität. Zugabe von TSA führt zu einer Aufhebung der durch ETO verursachten Hemmung und stellt die Promotoraktivität vollständig wieder her. Im Gegensatz zu ETO führt AML1/ETO zu einer Verstärkung der *HES1*-Promotoraktivität um beinahe das Doppelte (Abb. 4.15 A).

Die Aktivität des *Hey1*-Promotors wird durch die Überexpression von RBP-VP16 auf beinahe das 10-fache heraufgesetzt. Eine Kotransfektion steigender Mengen von ETO führt erneut zu einer zunehmenden Hemmung der Promotoraktivität. Die Hemmung wird durch TSA ebenfalls fast vollständig wieder aufgehoben. Dagegen zeigen auch steigende Konzentrationen an AML1/ETO keinen Einfluss auf die Promotoraktivität von *Hey1* (Abb. 4.15 B).

Hinweise, dass es sich um eine RBP vermittelte Transkriptionskontrolle handelt, geben Experimente mit dem Reporterkonstrukt pGA981/6. Dieses Konstrukt beinhaltet sechs hintereinander geschaltete EBNA-2 Bindestellen des Epstein-Barr Virus TP-1-Promotors, die 5' eines Globin Minimalpromotors liegen. Dadurch erhält man ein Konstrukt mit 12 RBP-J $\kappa$ -Bindestellen (133).



**Abb. 4.16: Die Transkriptionskontrolle von ETO und AML1/ETO ist RBP-J**κ**abhängig.** HeLa-Zellen wurden mit 0,5 μg des Reporterkonstrukts pGA981/6, einem RBP-VP16-Konstrukt und steigenden Konzentrationen (50 ng, 100 ng) der Expressionsplasmide für ETO oder AML1/ETO kotransfiziert. Zusätzlich wurden die Zellen 6 h vor der Zellernte mit dem HDAC-Inhibitor TSA (150 nM) inkubiert. ETO hemmt dosisabhängig die Promotoraktivität. Durch Zugabe von 150 nM TSA kann die Promotoraktivität vollständig wiederhergestellt werden. AML1/ETO zeigt keinen Einfluss auf die Promotoraktivität.

Die Kotransfektion des Reporters mit dem Expressionsplasmid für RBP-VP16 führt zu einer Aktivierung des Promotors auf ca. das 1000-fache seiner Grundaktivität. Durch die Überexpression von ETO wird die Aktivität des Promotors dosisabhängig um mehr als die Hälfte herabgesetzt. Erneut führt eine Inkubation mit TSA zu einer Aufhebung der ETO vermittelten Hemmung und zu einer Wiederherstellung der ursprünglichen Promotoraktivität. AML1/ETO zeigt keinen Einfluss auf die Aktivität des Promotors (Abb. 4.16).

# 4.5.3 ETO und AML1/ETO haben keinen Einfluss auf eine Notch-IC vermittelte Transkription

RBP-J $\kappa$  kann entweder nur SHARP oder nur die intrazellulären Domäne von Notch (Notch-IC) binden (132). Das Vorhandensein von SHARP bzw. eines SHARP-Repressorkomplexes an RBP-J $\kappa$  schließt eine Bindung von Notch-IC aus. Um zu kontrollieren, ob ETO bzw. AML1/ETO die durch Notch-IC vermittelte Promotoraktivierung beeinflussen, wurden HeLa-Zellen mit dem Reporter pGA981/6 und Expressionsplasmiden für murines Notch-I-C, ETO, AML1/ETO und SHARP (2770-3127) kotransfiziert (3.1.4). SHARP (2770-3127) enthält die RBP interagierende Domäne von SHARP (132).

Die Überexpression von Notch-IC führt zu einer 300-fachen Verstärkung der Grundaktivität des Promotors. Weder durch eine zusätzliche Expression von ETO noch von AML1/ETO kann die Promotoraktivität verändert werden. Dagegen führt die Überexpression von SHARP (2770-3127) zu einer Erniedrigung des Aktivitätslevels um ungefähr das 6-fache (Abb. 4.17). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass weder ETO noch AML1/ETO Teil eines RBP-Jk/Notch-IC-Aktivatorkomplexes sind. RBP-Jk rekrutierte Aktivatorkomplexe unterscheiden sich von den rekrutierten Repressorkomplexen in ihrer Zusammensetzung. Weiterhin wird bestätigt, dass SHARP im Wettbewerb mit Notch-IC um die Bindung an RBP-Jk steht und in der Lage ist, Notch-IC von RBP-J $\kappa$  zu verdrängen.



Abb. 4.17: Im Gegensatz zu ETO oder AML1/ETO hemmt SHARP die von Notch vermittelte Transkriptionsaktivierung von pGA981/6. HeLa-Zellen wurden mit dem Reporter pGA981/6 (0,5 µg), einem Expressionsplasmid für mNotch-1-IC und alternativ mit Expressionsplasmiden für ETO, AML1/ETO oder der RBP interagierenden Domäne von SHARP, Flag1-SHARP (2770-3127), kotransfiziert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Auswertung ergaben sich aus drei unabhängigen Experimenten. ETO und AML1/ETO haben keinen Einfluss auf die durch mNotch-1-IC vermittelte Promotoraktivität. SHARP führt dagegen zu einer Abnahme der Promotoraktivität um das 6-fache.

# 4.6 Überexpression von AML1/ETO und AML1/ETO(tr) führt zu einer transkriptionellen Aktivierung der Notch-Zielgene *Hey2* und *p21<sup>WAF1</sup>*

Um der Frage nachzugehen, ob AML1/ETO als Aktivator von Notch-Zielgenen fungiert, wurde das Fusionsprotein bzw. die C-terminal trunkierte Variante AML1/ETO(tr) in 293-HEK-Zellen überexprimiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Expressionsplasmiden für Notch-IC und RBP-VP16 transfiziert (3.1.3). Als Negativkontrolle diente der leere pcDNA3-Vektor. Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert (3.2.5). Anschließend erfolgte die Erststrangsynthese (3.2.6, C) und die Analyse über eine quantitative Real-Time-PCR. Die hierfür verwendeten Primer sind unter 2.9.2 aufgeführt. Wird AML1/ETO oder die trunkierte Form des Fusionsproteins in 293-HEK-Zellen überexprimiert, so führt dies zu einer Steigerung der Expression von Hey2 um das 2-5-fache und von p21<sup>WAF1</sup> um das 2-3-fache (Abb. 4.18). Dabei ist zu beobachten, dass AML1/ETO(tr), dem zwei wichtige Domänen (NHR3 und 4) für die Interaktion mit Korepressoren fehlen, die Transkription der beiden Notch-Ziele wesentlich stärker aktiviert als AML1/ETO.



**4.18 Überexpression von AML1/ETO und AML1/ETO(tr) in 293-HEK-Zellen.** 293-HEK-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für AML1/ETO, AML1/ETO(tr), Notch-IC und RBP-VP16 transfiziert. Als Negativkontrolle wurde der leere pcDNA3-Vektor eingesetzt. Die relative mRNA-Expression der Notch-Ziele *Hey2* und *p21<sup>WAF1</sup>* wurden über eine quantitative Real-Time-PCR bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Auswertung ergaben sich aus mindestens vier unabhängigen Experimenten. Als Standard wurde  $\alpha$ Aktin verwendet.

## 4.7 Ein spezifischer Knock-Down von AML1/ETO in Kasumi-Zellen führt zu einer transkriptionellen Herabregulation von Notch-Zielgenen

Durch die Überexpression von AML1/ETO konnte gezeigt werden, dass das Fusionsprotein endogene Notch-Zielgene aktiviert. Eine weitere Bestätigung dieses Ergebnisses ergaben sich aus Knock-Down-Experimenten in Kasumi-Zellen, die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. T. Borggrefe am MPI Freiburg durchgeführt wurden (150). Es konnte hierbei eine Abnahme der AML1/ETO-mRNA um ca. 40-50 % erzielt werden. Dies entspricht bereits publizierten Daten (62, 76). Dass der Knock-Down von AML1/ETO spezifisch ist, zeigt die Kontrolle von AML1, dessen relative mRNA-Konzentration sich nicht verändert. Durch den Knock-Down von AML1/ETO wurde eine Herunterregulierung der Notch-Zielgene *Nrarp, Cyclin D1* und *c-Myc* um mehr als die Hälfte erzielt (Abb. 4.19).

#### Ergebnisse



Abb. 4.19: Knock-Down von AML1/ETO in Kasumi-Zellen. AML1/ETO wurde mit einer spezifischen 25-Nukleotide umfassenden siRNA, die gegen die Fusionsstelle von AML1 und ETO gerichtet ist, ausgeschaltet. Kasumi-Zellen wurden mit dem Vektorkonstrukt, das für die Hairpin siRNA und GFP kodiert, transfiziert. GFP-positive und -negative Zellen wurden getrennt. Die Ermittlung der RNA-Konzentration erfolgte über Real-Time-PCR. GADPH dient als Standardwert. AML1/ETO wird spezifisch herunterreguliert. Zusätzlich erhält man eine Abnahme der mRNA-Expression von Nrarp, Cyclin D1 und c-Myc. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Auswertung ergaben sich aus vier unabhängigen Experimenten. (Quelle: (150)).

#### 4.8 AML1/ETO reguliert die Expression von Notch-Zielgenen direkt

Nach einem Modell von Alcalay et al., (2003) aktiviert AML1/ETO über eine transkriptionelle Hochregulation des Notch-Liganden Jagged-1 den Notch-Signaltransduktionsweg und somit die Transkription von *HES1* (2). Im nächsten Schritt sollte dieser Mechanismus der AML1/ETO-abhängigen Aktivierung des Notch-Zielgens *HES1* genauer untersucht werden. Um zu überprüfen, ob die Erhöhung der Aktivität des Notch-Zielgens *HES1* auf eine ligandenvermittelte Aktivierung der Notch-Signaltransduktion zurückzuführen ist, wurde der Presenilin-Inhibitor DAPT eingesetzt. Durch eine Inhibition von Presenilin kann die Abspaltung der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors und somit eine Signalweiterleitung verhindert werden.



Abb. 4.20: Die AML1/ETO vermittelte Transaktivierung der HES1-Transkription ist  $\gamma$ -Sekretase unabhängig. HeLa-Zellen wurden mit 1 µg des HES1-Reporterkonstrukts und Expressionsplasmiden für AML1/ETO bzw. mNotch-1-IC $\Delta$ E kotransfiziert. 24 h vor der Zellernte wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen des Presenilininhibitors DAPT inkubiert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Auswertung beziehen sich auf vier unabhängige Experimente. Bei mNotch-1-IC $\Delta$ E exprimierenden Zellen wird die *HES1*-Promotoraktivität nach Zugabe von DAPT herunterreguliert. Bei AML1/ETO exprimierenden Zellen zeigt sich keine Veränderung der Promotoraktivität nach DAPT Zugabe.

Zellen die entweder AML1/ETO oder zur Kontrolle mNotch1-IC $\Delta$ E exprimieren wurden mit steigenden Konzentrationen an DAPT für 24 h inkubiert. Bei mNotch1-IC $\Delta$ E handelt sich um den murinen Notch1-Rezeptor, dem die extrazelluläre Domäne fehlt und der somit einem konstitutiven Spaltungsprozess unterliegt. Wie zu erwarten, kann in Zellen, die mNotch1-IC $\Delta$ E exprimieren, durch DAPT die Aktivität des *HES1* kontrollierten Reporterkonstrukts um ungefähr die Hälfte herabgesetzt werden (Abb. 4.20). Dagegen kommt es bei einer AML1/ETO induzierten Aktivierung des *HES1* Promotors trotz steigender DAPT-Konzentration zu keiner Veränderung der Promotoraktivität (Abb. 4.20). Das Ergebnis deutet darauf hin, dass für die AML1/ETO vermittelte Aktivierung von *HES1* keine ligandenabhängige Aktivierung des Notch-Signaltransduktionswegs notwenig ist. Die Transkriptionskontrolle von *HES1* durch AML1/ETO verläuft vielmehr direkt an der Promotorregion von *HES1*.

## 4.9 Analyse weiterer Vertreter der ETO-Familie: Murines ETO-2 und *Xenopus laevis* ETO (xl) und XETOR

Vertreter der ETO-Familie konnten im Menschen, in der Maus, in Xenopus laevis und in *D. melanogaster* identifiziert werden (21, 70). Alle diese Proteine zeichnen sich durch vier konservierte Domänen, die Nervy homologen Regionen (NHR), aus. Aufgrund der teilweise hohen Sequenzähnlichkeit der NHR stellte sich die Frage, ob außer ETO andere Mitglieder der **ETO-Familie** auch im Notch-Signaltransduktionsweg eine Rolle spielen. Um dies zu untersuchen, wurde ein Vertreter aus der Maus, ETO-2, und zwei Vertreter aus X. laevis, ETO (xl) und XETOR, ausgewählt. ETO-2 wurde freundlicherweise von Dr. T. Borggrefe (MPI Freiburg), ETO (xl) und XETOR von Y. Cao (Universität Ulm) zur Verfügung gestellt. Zwischen murinem ETO-2 und humanem ETO besteht eine Sequenzähnlichkeit von 68,7 % (Tab. 4.1). Die für die Interaktion zwischen SHARP und ETO verantwortlichen Domänen NHR1 und NHR2 stimmen zu 96,9 % bzw. 86,6 % überein (Tab. 4.2/4.3). ETO (xl) aus X. laevis stimmt zu 94,8 % mit humanem ETO (Tab. 4.1) überein. Bei XETOR konnte dagegen nur eine Übereinstimmung von 58 % festgestellt werden. Die ersten beiden funktionellen Domänen NHR1 und 2 entsprechen sich bei ETO (xl) und ETO zu jeweils 100 % (Tab. 4.2/4.3). Zwischen XETOR und ETO konnte bei NHR1 eine Übereinstimmung zu 89,7 %, bei NHR2 zu 73,1 % festgestellt werden (Tab. 4.2/4.3).

Tab. 4.1: Bestimmung der Sequenzähnlichkeit und - unterschiede in % von humanem ETO, murinem ETO-2 und ETO (xl) und XETOR aus X. laevis. Die Werte im oberen Dreieck geben die Sequenzähnlichkeit an. Die Werte im unteren Dreieck geben die Sequenzunterschiede an.

	ETO	ETO-2	ETO (xl)	XETOR
ETO		68,7	94,8	58,0
ETO-2	33,3		71,0	52,4
ETO (xl)	4,6	30,0		59,1
XETOR	51,2	56,6	49,5	

Tab. 4.2: Bestimmung der Sequenzähnlichkeit und – unterschiede in % von NHR1 von humanem ETO, murinem ETO-2 und ETO (xl) und XETOR aus X. laevis. Die Werte im oberen Dreieck geben die Sequenzähnlichkeit an. Die Werte im unteren Dreieck geben die Sequenzunterschiede an.

	ETO	ETO-2	ETO (xl)	XETOR
ETO		96,9	100,0	89,7
ETO-2	3,2		96,9	89,7
ETO (xl)	0,0	3,2		89,7
XETOR	11,1	11,1	11,1	

Tab. 4.3: Bestimmung der Sequenzähnlichkeit und – unterschiede in % von NHR2 von humanem ETO, murinem ETO-2 und ETO (xl) und XETOR aus X. laevis. Die Werte im oberen Dreieck geben die Sequenzähnlichkeit an. Die Werte im unteren Dreieck geben die Sequenzunterschiede an.

	ETO	ETO-2	ETO (xl)	XETOR
ETO		86,6	100,0	73,1
ETO-2	14,8		86,6	71,6
ETO (xl)	0,0	14,8		73,1
XETOR	33,3	35,6	33,3	

## 4.9.1 Murines ETO-2

## 4.9.1.1 ETO-2 interagiert mit SHARP-RD in vitro und in vivo

Die Interaktion von ETO-2 mit der SHRP-RD wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* überprüft. Für den GST-Pull-Down (3.3.12) wurden Glutathion-Sepharose-Beads mit GST allein, GST-SHARP-RD (3477-3628) oder GST-SHARP-RD (3477-3664) beladen. ETO-2 wurde *in vitro* translatiert und radioaktiv markiert.

Eine Interaktion von ETO-2 mit GST-SHARP-RD (3477-3664) konnte nachgewiesen werden (Abb. 4.21 A, Reihe 4). Sowohl bei GST allein (Abb. 4.21 A, Reihe 2) als auch bei der verkürzten GST-SHARP-RD (3477-3628) (Abb. 4.21 A, Reihe 3) kam es zu keiner Interaktion mit ETO-2. Zur Bestätigung der Interaktion *in vivo* wurden IP-Experimente (3.3.8 A) durchgeführt. Hierfür wurden 293-HEK-Zellen mit der Flag-fusionierten SHARP-RD und ETO-2 kotransfiziert (3.1.3). Zur Kontrolle wurden die Zellen entweder nur mit pcDNA3-Flag1-SHARP-RD oder nur pcDNA3-ETO-2 transfiziert (3.1.3). Für die IP wurden die aus den Zellen hergestellten Gesamtzellproteinextrakte (3.3.1) mit anti-Flag Antikörper beschichteter M2-Flag-

Beads über Nacht inkubiert. Wurden die Zellen nur mit einem Konstrukt transfiziert, so erfolgte keine Präzipitation (Abb. 4.21 B, Reihe 1 und 2). Nur nach einer Kotransfektion konnte ETO-2 mit der Flag1-SHARP-RD präzipitiert werden (Abb. 4.21 B, Reihe 3). Somit kann gezeigt werden, dass auch ETO-2 wie humanes ETO in der Lage ist mit der SHARP-RD *in vitro* und *in vivo* zu interagieren.



**Abb. 4.21:** (A) ETO-2 interagiert mit SHARP-RD *in vitro* im GST-Pull-Down. Glutathion-Sepharose-Beads wurden entweder mit GST, GST-SHARP-RD (3477-3628) oder GST-SHARP-RD (3477-3664) beschichtet und mit *in vitro* translatiertem [<sup>35</sup>S]-Methionin markiertem ETO-2 inkubiert. ETO-2 bindet nur mit GST-SHARP-RD (3477-3664) (Reihe 4). GST (Reihe 2) allein und GST-SHARP-RD (3477-3628) (Reihe 3) gehen keine Bindung mit ETO-2 ein. (B) IP zur Kontrolle der Interaktion von ETO-2 und SHARP *in vivo*. 293-HEK-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für Flag1-SHARP-RD und ETO-2 einzeln oder zusammen transfiziert. Die Expression von Flag1-SHARP-RD wurde im Western-Blot mit einem anti-Flag Antikörper (oberer Blot), die Expression von ETO-2 mit einem anti-ETO-2 Antikörper (mittlerer und unterer Blot) kontrolliert. Nur in Lysaten kotransfizierter Zellen konnte ETO-2 kopräzipitiert werden. IP: Immunpräzipitation; WB: Western-Blot.

ETO-2 ist wie humanes ETO ein nukleäres Protein (25). Zusammen mit der Bestätigung der Interaktion von ETO-2 mit SHARP ist anzunehmen, dass die beiden Proteine im Zellkern kolokalisieren. In diesem Zusammenhang wurden IF-Experimente durchgeführt.

293-HEK-Zellen wurden mit den Konstrukten pcDNA3-ETO-2 und pcDNA3-Flag2-SHARP kotransfiziert (3.1.3). ETO-2 wurde mit einem anti-ETO-2 Primärantikörper und einem FITC konjugierten anti-Ziege IgG Sekundärantikörper gefärbt. Flag2-SHARP wurde mit einem anti-SHARP Primärantikörper und einem Cy3-konjugierten anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper gefärbt.

ETO-2 (Bild a) und Flag2-SHARP (Bild b) kolokalisieren im Zellkern der 293-HEK-Zellen (Abb. 4.22, Bild c und d).

#### Ergebnisse



Abb. 4.22: Kolokalisation von SHARP und ETO-2. 293-HEK-Zellen wurden mit jeweils 2 µg ETO-2 und Flag2-SHARP Expressionsplasmiden kotransfiziert. 18 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert. ETO-2 wurde mit einem anti-ETO-2 Primärantikörper und einem FITC konjugierten anti-Ziege IgG Antikörper gefärbt. Für Flag2-SHARP wurde ein anti-SHARP Primärantikörper und ein Cy3 konjugierter anti-Kaninchen IgG Antikörper verwendet. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung. ETO-2 (Bild a) und Flag2-SHARP (Bild b) kolokalisieren im Zellkern (Bild c und d).

### 4.9.1.2 ETO-2 interagiert nicht mit RBP-J $\kappa$

Als nächstes stellte sich die Frage, ob ETO-2 eine Bindung mit RBP-J $\kappa$  eingeht. Um dies zu untersuchen, wurden für einen GST-Pull-Down (3.3.12) Glutathion-Sepharose-Beads mit GST-gekoppeltem RBP-J $\kappa$  und als Positivkontrolle GST-SHARP-RD beladen. ETO-2 wurde *in vitro* translatiert (3.3.10). Als Negativkontrolle dienten Beads, die mit GST allein beladen waren.



**Abb. 4.23: ETO-2 interagiert nicht direkt mit RBP-J** $_{\kappa}$  im GST-Pull-Down. GST, GST-RBP-J $_{\kappa}$  und GST-SHARP-RD wurden an Glutathion-Sepharose-Beads gekoppelt und mit *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem ETO-2 inkubiert. ETO-2 bindet nur an GST-SHARP-RD. Es kommt zu keiner Interaktion mit GST allein oder GST-RBP-J $_{\kappa}$ .

Wie bei humanem ETO bindet ETO-2 nur an GST-SHARP-RD (Abb. 4.23, Reihe 4). Es kommt zu keiner Interaktion mit RBP-J $\kappa$  oder GST allein (Abb. 4.23, Reihe 2 und 3).

## 4.9.1.3 ETO-2 ist ein HDAC-abhängiger Korepressor zu SHARP

Zur funktionellen Analyse von ETO-2 in Zusammenhang mit SHARP wurden Transfektionsexperimente durchgeführt (3.3.15). Hierfür wurden HeLa-Zellen mit dem Reporter pFR-Luc, den Expressionsplasmiden für G4-VP16 bzw. G4-VP16-SHARP-RD und ETO-2 (50 ng, 100 ng) kotransfiziert (3.1.4).



**Abb. 4.24: Funktionelle Charakterisierung von ETO-2 im Transfektionsexperiment.** HeLa-Zellen wurden mit 1 µg pFR-Luc und Expressionsplasmiden für G4-VP16 bzw. G4-VP16-SHARP-RD und ETO-2 (50 ng, 100 ng) kotransfiziert. 6 h vor der Zellernte wurden den Zellen 100 nM des HDAC-Inhibitors TSA zugegeben. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Auswertung ergaben sich aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. ETO-2 verstärkt die durch SHARP vermittelte Hemmung der Promotoraktivität um mehr als das Doppelte. Durch Zugabe von TSA kann die Promotoraktivität weitgehend wiederhergestellt werden.

Eine Überexpression von ETO-2 führt zu einer ca. 4-fachen Verstärkung der von SHARP-RD vermittelten Hemmung der Promotoraktivität (Abb. 4.24). Die HDAC-Abhängigkeit der hemmenden Wirkung von ETO-2 und SHARP wurde durch den HDAC-Inhibitor TSA getestet. Kotransfizierte Zellen wurden 6 h vor der Zellernte mit TSA (100 nM) inkubiert. Durch TSA konnte die Promotoraktivität beinahe vollständig wiederhergestellt werden (Abb. 4.24).

Zusätzlich wurde der Einfluss von ETO-2 auf die Notch-Zielgene *HES1* und *Hey1* untersucht. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit den Reporterkonstrukten HES1-Luc (1 µg) und Hey1(-95/+87)-Luc (1 µg), dem Expressionsplasmid für RBP-VP16 und steigenden Mengen (100 ng, 150 ng) ETO-2 kotransfiziert. Um den Einfluss von TSA auf ETO-2 zu testen, wurden 6 h vor der Zellernte 150 nM des HDAC-Inhibitors auf

die Zellen gegeben. Nach 24 h erfolgten die Zellernte und die Messung der Luciferase-Aktivität (3.3.15).



Abb.4.25: ETO-2 reprimiert die RBP-J<sub>K</sub> vermittelte Transkription der Notch-Zielgene HES1 und Hey1. HeLa-Zellen wurden mit den Reporterkonstrukten HES1-Luc (1  $\mu$ g) (A), oder Hey1(-95/+87)-Luc (1  $\mu$ g) (B) zusammen mit Expressionsplasmiden für RBP-VP16 und ETO-2 (100 ng, 150 ng) kotransfiziert. Zusätzlich wurden kotransfizierte Zellen mit 150 nM des HDAC-Inhibitors TSA für 6 h inkubiert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Auswertung ergaben sich aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Überexprimiertes ETO-2 hemmt dosisabhängig die Promotoraktivität der beiden Reporterkonstrukte. TSA-Zugabe führt bei *HES1* (A) zu einer vollständigen Wiederherstellung der Promotoraktivität. Die *Hey1*-Promotoraktivität (B) kann durch TSA nur zu einem Teil wieder gesteigert werden.

Durch eine Überexpression von RBP-VP16 kann wie bereits gezeigt die Promotoraktivität von *HES1* um das 11-fache (Abb. 4.25 A), bei *Hey1* um beinahe das 8-fache (Abb. 4.25 B) erhöht werden. Eine steigende Expression von ETO-2 führt in beiden Fällen zu einer zunehmenden Hemmung der Promotoraktivität (Abb. 4.25 A und B). Durch die Zugabe von TSA kann die *HES1*-Promotoraktivität weitgehend wiederhergestellt werden (Abb. 4.25 A). Dagegen kann die *Hey1*-Promotoraktivität nur geringfügig wieder angehoben werden (Abb. 4.25 B).

Die Ergebnisse aus diesen Experimenten zeigen, dass analog zu ETO, auch murines ETO-2 als HDAC-abhängiger Repressor der Transkription der Notch-Zielgene HES1 und Hey1 fungiert.

## 4.9.2 X. laevis ETO (xl) und XETOR

## 4.9.2.1 Im Gegensatz zu XETOR interagiert X. laevis ETO (xI) mit SHARP-RD

Die Interaktion zwischen der SHARP-RD und ETO (xl) bzw. XETOR wurde *in vitro* über einen GST-Pull-Down (3.3.12) untersucht. ETO (xl) und XETOR wurden im zellfreien System translatiert und mit [<sup>35</sup>S]-Methionin markiert (3.3.10). Als Negativkontrolle wurden Glutathion-Sepharose-Beads verwendet, die nur mit GST allein beladen waren.



**Abb. 4.26:** *In vitro* Interaktion von ETO (xl) und XETOR mit SHARP-RD. Glutathion-Sepharose-Beads wurden entweder mit GST allein oder mit GST-SHARP-RD beschichtet. Anschließend wurden die Beads mit zellfrei synthetisiertem, radioaktiv markiertem ETO (xl) oder XETOR inkubiert. Nur ETO (xl) bindet an GST-SHARP-RD (Reihe 4). GST-SHARP-RD interagiert nicht mit XETOR (Reihe 6). Beide Proteine binden nicht an GST allein (Reihe 3 und 5).

Eine Interaktion mit der GST fusionierten SHARP-RD konnte nur bei ETO (xl) erhalten werden. XETOR dagegen interagiert überraschenderweise nicht mit GST-SHARP-RD (Abb. 2.26, Reihe 4 und 6). In beiden Fällen findet keine Interaktion mit GST allein statt (Abb. 4.26, Reihe 3 und 5).

## 4.9.2.2 X. laevis ETO agiert als Korepressor zu SHARP

Zur funktionellen Charakterisierung von ETO (xl) und XETOR wurden HeLa-Zellen mit dem Reporter pFR-Luc, Expressionsplasmiden für GAL4-VP16 bzw. GAL4VP16-SHARP-RD und steigenden Konzentrationen (100 ng, 200 ng) an ETO (xl) und XETOR Expressionsplasmiden kotransfiziert (3.1.4). Wie in den vorangegangenen Experimenten setzt SHARP-RD die Promotoraktivität stark herab. Durch eine

#### Ergebnisse

zusätzliche Überexpression von ETO (xl) wird die hemmende Wirkung von SHARP-RD dosisabhängig noch um das 8-fache verstärkt. Wird dagegen XETOR überexprimiert, führt dies nicht zu einer signifikanten Veränderung der Luciferase-Aktivität (Abb. 4.27 A). Dieses Verhalten von XETOR würde durch das Ergebnis des GST-Pull-Downs (4.9.2.1) unterstützt, in dem keine Interaktion von XETOR mit SHARP festgestellt werden konnte. Zur Analyse der HDAC-Abhängigkeit von ETO (xl) wurden die transfizierten Zellen wiederum mit TSA behandelt. Die durch SHARP-RD und ETO (xl) herbeigeführte Hemmung der Promotoraktivität kann durch den Einsatz von TSA wieder vollständig aufgehoben werden (Abb. 4.27 B).



**Abb. 4.27:** (A) und (B) Funktionelle Charakterisierung von ETO (xl) und XETOR. HeLa-Zellen wurden mit 1 µg des Reporters pFR-Luc, den Expressionsplasmiden für G4-VP16 bzw. G4-VP16-SHARP-RD und steigenden Konzentrationen (100 ng, 150 ng) ETO (xl) oder XETOR kotransfiziert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Auswertung wurden aus mindestens vier unabhängigen Experimenten ermittelt (A) Im Gegensatz zu XETOR verstärkt ETO (xl) dosisabhängig die durch G4-VP16-SHARP-RD verursachte Hemmung der Promotoraktivität um ca. das 14-fache. XETOR unterbricht die durch die SHARP-RD verursachte Hemmung. (B) Bestimmung der HDAC-Abhängigkeit von ETO (xl) und SHARP. Die transfizierten Zellen wurden 6 h vor der Zellernte mit dem HDAC-Inhibitor TSA (100 nM) inkubiert. Nach Zugabe von TSA kann die Promotoraktivität wieder vollständig hergestellt werden.

Zusammengenommen zeigen diese Experimente, dass wie humanes ETO auch ETO-2 und ETO (xl) als weitere Vertreter der ETO-Familie mit SHARP interagieren. Auch in funktionellen Untersuchungen verhielten sich ETO-2 und ETO (xl) als HDAC-abhängige Korepressoren zu SHARP. Im Gegensatz dazu zeigte XETOR weder eine Interaktion mit SHARP noch agierte es als transkriptioneller Korepressor.

### 5. Diskussion

Im Notch-Signaltransduktionsweg besitzt RBP-Jk eine Schlüsselposition. In Verbindung mit der intrazellulären Domäne von Notch fungiert es als aktivierender Transkriptionsfaktor. Dabei wird der zuvor an RBP-Jκ gebundene Repressorkomplex durch Notch verdrängt. Gleichzeitig kommt es zu einer Rekrutierung von weiteren Koaktivatoren wie MAML-1 und den Histonacetyltransferasen p300, P/CAF, GCN5 und CBP an RBP-J $\kappa$  (86, 133, 171, 184). In Abwesenheit von Notch-IC verhindert RBP-J $\kappa$  die Transkription von Notch-Zielgenen, indem es Repressorkomplexe rekrutiert, SMRT/NcoR, CIR, SAP30, HDAC1 und HDAC2 konnten als Komponenten dieser Komplexe identifiziert werden (69, 75, 194). Die Anwesenheit von HATs und HDACs zeigt, dass die Transkriptionskontrolle von RBP-Jk auch auf der Modifizierung von und somit auf einer Änderung Histonen der Chromatinkonformation beruht.

Eine vorangegangene Arbeit identifizierte SHARP, ein Mitglied der Spen-Proteinfamilie, als RBP-J $\kappa$  bindendes Protein (132). SHARP fungiert als Korepressor zu RBP-J $\kappa$  und hemmt in Zusammenhang mit dem Heterodimer CtIP/CtBP die Transkription von *Hey1* (134). In der vorliegenden Arbeit wurden neue Interaktionspartner von SHARP, ETO und AML1/ETO, identifiziert und ihre Funktion im Notch-Signaltransduktionsweg charakterisiert.

## 5.1 Identifizierung von ETO und AML1/ETO als neue Komponenten von RBP- $J\kappa$ /SHARP-Komplexen

Mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems wurde aus einer humanen embryonalen Gehirnbibliothek ein mit der Repressionsdomäne von SHARP interagierendes Proteinfragment isoliert. Sequenzanalysen ergaben, dass es ich bei diesem Fragment um ETO handelte. Über Interaktionsexperimente *in vitro* und *in vivo* sowie mit endogen exprimierten Proteinen konnte die Interaktion zwischen SHARP und ETO eindeutig bestätigt werden. Analysen mit Deletionsmutanten ergaben, dass zwei funktionelle Domänen von ETO, NHR1 und NHR2, für die Interaktion mit SHARP verantwortlich sind. Beide Domänen können unabhängig voneinander an SHARP binden. Dass die Bindung zu SHARP unabhängig über zwei Domänen vermittelt wird, wurde bereits bei Analysen anderer ETO-Interaktionen gefunden (3, 65, 90, 101). NHR1 und NHR2 sind für die Interaktion mit weiteren Repressorproteinen wie Sin3A, HDAC1 und HDAC3 und NcoR verantwortlich (3, 90).

Es wird davon ausgegangen, dass ETO Teil von Multiproteinkomplexen darstellt (65, 146). Die Interaktionen von ETO mit anderen Repressorproteinen über jeweils mehrere unabhängige Epitope erlaubt eine große Variabilität an möglichen Bindungen. Sin3A, NcoR und die mit ihnen assoziierten HDACs sind Teil verschiedener Repressorkomplexe. Da ETO mit beiden interagiert, wird angenommen. dass ETO auch als Adapter zwischen verschiedenen Repressorkomplexen fungieren kann (30, 70, 90). Es besteht ebenso die Möglichkeit, dass ETO mit unterschiedlichen Repressorkomplexen in unterschiedlichen Zelltypen assoziiert. Heterodimerisierungen zwischen verschiedenen ETO-Familienmitgliedern kann die Komplexität der gebildeten Repressorkomplexe noch weiter erhöhen (146). Die Rekrutierung von ETO an RBP-Jk/SHARP würde somit die Annahme unterstützen, dass in Abhängigkeit des Zelltyps verschiedene Repressorkomplexe an den Promotorregionen von Notch-Zielgenen gebunden vorliegen.

ETO ist fast vollständig im Fusionsprotein AML1/ETO vertreten. Interaktionsexperimente *in vitro* und *in vivo* bestätigten, dass auch AML1/ETO mit der Repressionsdomäne von SHARP interagiert. Dass über den ETO-Anteil des Fusionsproteins AML1/ETO Korepressoren rekrutiert werden, ist bereits in Bezug auf NcoR, SMRT und andere Repressorproteine gezeigt worden (3, 101, 172).

Nur die vollständige SHARP-RD war in der Lage, an ETO bzw. AML1/ETO zu binden. Eine C-terminale Deletion von 36 Aminosäuren war ausreichend, um eine Interaktion zu verhindern. Untersuchungen bezüglich der Interaktion von SHARP mit CtIP zeigten dasselbe Ergebnis (134). Wahrscheinlich kommt es durch die Deletion zu Konformationsänderungen der RD, was dazu führen kann, dass die für die Interaktion verantwortlichen Epitope nicht mehr an der Proteinoberfläche liegen. Für eine genauere Eingrenzung der für die Interaktion verantwortlichen Aminosäuren innerhalb der RD könnten Punktmutationen herangezogen werden. Bereits 2003 wurden von Ariyoshi vier Punktmutationen innerhalb der RD beschrieben, die die

Bindung zu NcoR unterbrechen (4). Diese Punktmutationen könnten als erste Anhaltspunkte zu einer weiteren Untersuchung der Interaktion der Repressionsdomäne mit ETO herangezogen werden.

Wie ETO so besitzt auch SHARP die Möglichkeit über die Repressionsdomäne mit unterschiedlichen Proteinen bzw. Proteinkomplexen Bindungen einzugehen. So ist es wahrscheinlich, dass verschiedene RBP-Jĸ/SHARP-Proteinkomplexe abhängig vom jeweiligen Notch-Zielgen und vom Zelltyp existieren.

ETO-AML1/ETO-haltige RBP-Jĸ-Komplexe und konnten über RBP-Jĸ-Aufreinigungen und Immunpräzipitationen aus ETO bzw. AML1/ETO exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. Weitere Hinweise ergaben sich durch Kolokalisationsexperimente mit RBP-J $\kappa$  und SHARP. Zwischen ETO und RBP-J $\kappa$ konnte keine direkte Bindung nachgewiesen werden. Eine sehr schwache Interaktion zwischen AML1/ETO und RBP-Jk in vitro ist weder auf die AML1-Runt-Domäne noch auf den ETO-Anteil alleine zurückzuführen. Wahrscheinlich kommt diese schwache Bindung erst durch ein Zusammenwirken des AML1- und des ETO-Anteils des Fusionsproteins zustande. Für eine Verifizierung der Interaktion zwischen ETO bzw. AML1/ETO und RBP-J<sub>K</sub> in vivo hätte man Koimmunpräzipitationsexperimente in SHARP defizienten Zellen durchführen müssen. Diese Zellen standen jedoch nicht zur Verfügung.

#### 5.2 ETO fungiert als Korepressor zu SHARP

ETO wird unter anderem im Nervengewebe, im Herzen und in hämatopoetischen 148. 180). Seine entwicklungsbiologischen Zellen exprimiert (34, und physiologischen Funktionen in diesen Gewebetypen sind jedoch noch weitgehend ungeklärt. In dieser Arbeit wurde ETO als Korepressor zu SHARP identifiziert. ETO ist bereits in Verbindung mit anderen Repressorproteinen beschrieben. Es bindet unter anderem an die Korepressorproteine SMRT und NcoR (90, 101, 172). SMRT und NcoR sind beteiligt bei der transkriptionellen Repression, die durch nicht ligandengebundene nukleäre Rezeptoren z.B. des Thyroxinrezeptors oder des Retinolsäurerezeptors vermittelt wird (91). Des Weiteren interagiert ETO direkt oder indirekt mit Vertretern der HDAC-Familie (70). Durch die Interaktion mit HDACs wird angenommen, dass der zugrunde liegende Mechanismus der ETO-vermittelten Repression unter anderem über eine Modifikation von Histonen (Deacetylierung) verläuft.

Bis jetzt konnten nur indirekte Zusammenhänge zwischen dem Notch-Signaltransduktionsweg und der ETO-Familie festgestellt werden. In D. melanogaster zum Beispiel reguliert Notch die Entwicklung von Chemo-/Mechanorezeptoren (Chaetae). Diese bestehen aus insgesamt vier Zellen, die sich aus einer gemeinsamen neuronalen Vorläuferzelle ("Sensory organ precursor", SOP) entwickeln. Diese Vorläuferzelle entsteht innerhalb eines Clusters an equipotenten Zellen. Durch Hochregulation des Notch-Liganden Delta-1 in einer dieser Zellen, der zukünftigen Vorläuferzelle, wird in den umliegenden Zellen der Notch-Signaltransduktionsweg aktiviert. Dadurch wird verhindert, dass die Nachbarzellen ebenfalls eine neuronale Entwicklung durchlaufen. Nervy, das D. melanogaster Homolog von ETO, ist an der Differenzierung der neuronalen Vorläuferzelle beteiligt (179). Nervy wird im SOP exprimiert und sorgt dort indirekt für die Hochregulation von Delta-1. Ob allerdings in D. melanogaster ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Nervy und Hairless, dem funktionellen Homolog zu humanem SHARP, besteht wie zwischen ETO und SHARP ist nicht bekannt.



Abb. 5.1: Schematische Darstellung eines ETO/SHARP/RBP-J $\kappa$ -Repressorkomplexes. Über SHARP wird ETO an RBP-J $\kappa$  rekrutiert. Über seine funktionellen Domänen ist ETO in der Lage, noch weitere Korepressorproteine zu binden. Dieser Repressorkomplex hemmt die Transkription der Notch-Zielgene *HES1* und *Hey1*.

Diese Arbeit zeigt einen direkten Zusammenhang zwischen dem Notch-Signaltransduktionsweg und ETO. ETO konnte als Teil eines funktionellen Repressorkomplexes, der von RBP-J $\kappa$  rekrutiert wird, identifiziert werden. ETO bindet indirekt durch SHARP an RBP-J $\kappa$  und hemmt HDAC-abhängig die Expression von HES1 und Hey1. Es ist wahrscheinlich, dass noch weitere Korepressorproteine an der durch ETO und SHARP vermittelten Transkriptionskontrolle beteiligt sind (Abb. 5.1). Dieser Annahme muss allerdings noch in weiteren Experimenten nachgegangen werden.

### 5.3 Mechanismen der von AML1/ETO gestörten Hemmung von Notch-Zielgenen

Wie viele andere Transkriptionsfaktoren ist auch AML1/ETO sowohl als transkriptioneller Repressor zum anderen aber auch als transkriptioneller Aktivator beschrieben. Eine hochregulierende Wirkung von AML1/ETO auf die Expression wurde unter anderem bei M-CSFR, Bcl-2 und p21<sup>WAF1</sup> festgestellt (79, 137, 144). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind allerdings noch weitgehend unklar. Zusammenhängend mit dem zellulären Hintergrund scheint die Funktion als Transkriptionsaktivator zum Teil von der Koexpression von AML1 und AML1/ETO als auch von der Existenz von AML1-DNA-Bindestellen abhängig zu sein. Im Fall des "macorphage-colony-stimulating-factor" Rezeptor, M-CSFR, einem AML1-Zielgen, wurde ein Zusammenwirken von AML1 und AML1/ETO beobachtet. Solange die Konzentration von AML1/ETO der von AML1 in der Zelle entspricht, verstärkt das Fusionsprotein die aktivierende Wirkung von AML1 (144). Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass AML1/ETO potentielle Korepressoren von AML1 abfängt. Dadurch wird AML1 in Richtung seiner Funktion als transkriptioneller Aktivator dirigiert (95). Die Aktivierung der Expression von Bcl-2 durch AML1/ETO ist auf ein Zusammenwirken der Runt-Domäne und dem C-Terminus von ETO zurückzuführen (79). Spätere Untersuchungen stellen allerdings in Frage, ob Bcl-2 in vivo tatsächlich ein Ziel von AML1/ETO ist (7, 156). Obwohl bei p21<sup>WAF1</sup> mehrere AML1-DNA-Bindestellen im Promotor gefunden wurden, wird hier ein indirekter Mechanismus der Aktivierung der p21<sup>WAF1</sup>-Transkription vermutet (137).

In dieser Arbeit konnte über Luciferase-Experimente gezeigt werden, dass AML1/ETO aktivierend auf ein Gal4-abhängiges Reporterkonstrukt wirkt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass AML1/ETO in Abhängigkeit von RBP-J $\kappa$  die Transkription des Notch-Effektors HES1 hochreguliert. Des Weiteren konnte eine Aktivierung von Notch-Zielgenen durch AML1/ETO durch Knock-Down-Experimente in Kasumi-Zellen und durch die Überexpression von AML1/ETO bzw. der C-terminal trunkierten Form, AML1/ETO(tr), in 293-HEK-Zellen bekräftigt werden. Dass die trunkierte Form von AML1/ETO stärker aktiviert als das vollständige Fusionsprotein, ist wahrscheinlich auf den Verlust des C-Terminus und somit der letzten beiden funktionellen Domänen NHR3 und 4 zurückzuführen. Diese spielen eine maßgebliche Rolle bei der Rekrutierung von Korepressoren wie SMRT oder HDACs (51, 138).

Welcher Mechanismus liegt der AML1/ETO-abhängigen Aktivierung von Notch-Zielgenen zugrunde? Alcalay (2003) beschreibt eine indirekte Hochregulierung von HES1 durch AML1/ETO über den Notch-Liganden Jagged-1 (2). Ein solcher indirekter Mechanismus konnte durch Inhibition der Notch-Signaltransduktion mit dem Presenilin-Inhibitor DAPT ausgeschlossen werden. Der Aktivitätslevel des *HES1*-Promotors blieb nach Aktivierung durch AML1/ETO trotz der Unterbrechung der Notch-Signaltransduktion unverändert. AML1/ETO kann somit direkt die Transaktivierung von *HES1* kontrollieren.

Der ETO-Anteil ist für die Rekrutierung von Korepressoren an das Fusionsprotein verantwortlich (51, 101, 172). Die Bindung von AML1/ETO an RBP-J $\kappa$ /SHARP kann dazu führen, dass eine weitere Interaktion zwischen dem ETO-Anteil und entsprechenden Korepressoren aufgrund der räumlichen Anordnung der Proteine gestört oder vermindert wird. Des Weiteren kann die Bildung eines Komplexes aus AML1/ETO, SHARP und RBP-J $\kappa$  auch eine Rekrutierung von Repressorproteinen durch SHARP stören.

AML1/ETO besitzt fünf funktionelle Domänen, die AML1-Runt-Domäne und NHR1-4 des ETO-Anteils. Über die Runt-Domäne werden vor allem Proteine rekrutiert, die aktivierend auf die Transkription wirken (138). Erste Anhaltspunkte, dass Interaktionspartner der Runt-Domäne die Funktion von AML1/ETO maßgeblich in Richtung einer Aktivierung beeinflussen, ergaben sich aus Luciferase-Experimenten. Die Aktivität des Gal4-abhängigen Reporterkonstrukts pFR-Luc wird durch die Koexpression von G4-VP16-SHARP-RD, AML1/ETO und der AML1-Runt-Domäne um das bis zu 5-fache reduziert werden (Abb. 5.2). Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt ist, dass der zunehmende Überschuss an AML1-Runt in Konkurrenz tritt mit einer limitierten Menge an vorliegenden Interaktionspartnern für AML1/ETO. Dadurch wird eine Wiederherstellung der Repressoraktivität von AML1/ETO erzielt.



Abb. 5.2: Rekonstitution der Repressoraktivität von AML1/ETO durch steigende Konzentrationen der AML1-Runt-Domäne. HeLa-Zellen wurden mit dem Reporterkonstrukt pFR-Luc (1 µg) und den Expressionsplasmiden für G4-VP16-SHARP-RD, AML1/ETO und steigenden Mengen der AML1-Runt-Domäne (50 ng, 100 ng, 150 ng) kotransfiziert. Steigende Konzentrationen der Runt-Domäne führen zu einer bis zu 5-fachen Abnahme der Promotoraktivität.

Aufgrund der Daten aus der vorliegenden Arbeit Daten lässt sich somit ein vorläufiges Modell der Funktionsweise von AML1/ETO an Promotoren von Notch-Zielgenen erstellen. Dieses Modell beschreibt AML1/ETO als funktionslosen oder gestörten Korepressor zu SHARP. Der Verlust der Repressorfunktion kann durch eine Konkurrenz zwischen dem N-Terminus (Runt-Domäne) und C-Terminus (ETO-Anteil) und der damit verbundenen Rekrutierung von Kofaktoren vermittelt werden. Die Interaktion von Koaktivatoren mit der Runt-Domäne und/oder sterische Hinderungen durch die Bindung von AML1/ETO an RBP-JK/SHARP kann die Interaktion zwischen ETO und Korepressoren verhindern oder zumindest stören, was zu einer Aktivierung oder Derepression von Notch-Zielgenen führt (Abb. 5.3 A). Dieses Modell wird dadurch unterstützt, dass AML1/ETO(tr) durch den Verlust des C-Terminus einen stärkeren Aktivator von Notch-Zielgenen darstellt als das vollständige AML1/ETO. Die Interaktion der Runt-Domäne mit Koaktivatoren scheint maßgeblich an der Funktionsstörung des Proteins beteiligt zu sein, da die Repressorfunktion von AML1/ETO nach zusätzlicher Expression der AML1-Runt Domäne wieder hergestellt werden kann. Die überexprimierte AML1 Runt-Domäne dient in diesem Experiment als Konkurrent für die Interaktion von AML1/ETO mit zellulären Koaktivatoren (Abb. 5.3 B).



\*: Mutationen der AML1-Runt-Domäne

Abb. 5.3: Schematische Darstellung eines AML1/ETO-SHARP-RBP-J $\kappa$ -Komplexes und dessen Funktionsprinzip an Promotoren von Notch-Zielgenen. (A) AML1/ETO wird über SHARP an RBP-J $\kappa$  rekrutiert. Die Interaktion mit Koaktivatoren über die AML1-Runt-Domäne kann zu einer Störung der Interaktion mit Korepressoren über den ETO-Anteil und somit zu einer Aktivierung von Notch-Zielgenen führen. (B) Durch die Unterbrechung der Interaktion mit Koaktivatoren könnte die Repressorfunktion von AML1/ETO wiederhergestellt werden.

AML1 und AML1/ETO heterodimerisieren über die Runt-Domäne vor allem mit CBF $\beta$  (124, 125, 163). CBF $\beta$  verstärkt die Transaktivierung von AML1-Zielgenen (124, 125, 173). Somit könnte das Heterodimer AML1/ETO-CBF $\beta$  auch zur Aktivierung von Notch-Zielgenen beitragen. Um diese Hypothese genauer zu untersuchen, könnte die Interaktion zwischen der AML1-Runt-Domäne und CBF $\beta$  durch gezielte Mutagenese innerhalb der AML-Runt Domäne zerstört werden. Ein so mutiertes AML1/ETO Fusionsprotein könnte daraufhin in funktionellen Untersuchungen auf eine Rekonstituierung der transkriptionellen Repressoreigenschaften überprüft werden.

Die Runt-Domäne ist jedoch auch für die Interaktion mit weiteren Koaktivatoren wie Mitglieder der Ets-Familie oder GATA-1 verantwortlich (138). Inwieweit diese Kofaktoren die Repressortätigkeit von AML1/ETO beeinflussen, könnte analog wie oben beschrieben mit gezielten Punktmutationen untersucht werden.

## 5.4 Die Rolle des Notch-Signaltransduktionswegs bei der Entstehung von Leukämie

Die Rolle des Notch-Signaltransduktionswegs während der Hämatopoese ist vielseitig. Er ist an der Differenzierung von lymphoiden Zellen beteiligt. Hierbei ist besonders gut die Differenzierung von T-Zellen untersucht (28, 105). Konstitutiv aktive Deletionsmutanten von Notch-1 sind für die Entstehung der akuten T-Zell-Leukämie (T-ALL) verantwortlich (31, 147). Zusammen mit dem Notch-Liganden Jagged-1 sorgt der Notch-Signaltransduktionsweg für den Erhalt von primitiven Vorläuferzellen im Knochenmark (169). In Bezug auf myeloide Zellen verhindert ein aktiver Notch-Signaltransduktionsweg die Ausdifferenzierung von myeloiden Vorläuferzellen auch unter Einfluss von Zytokinen wie G-CSF oder GM-CSF (10, 81, 112). Des Weiteren begünstigt der Notch-Signaltransduktionsweg die Selbsterneuerung von hämatopoetischen Stammzellen (105).

Der Beitrag von AML1/ETO zur Entstehung von Leukämien ist noch nicht vollständig geklärt. Wie das aktive Notch trägt das Fusionsprotein zum Erhalt des Stammzellcharakters und zur Verhinderung der Ausdifferenzierung früher Vorläuferzellen bei (2, 119). Die Ausdifferenzierung von myeloiden Vorläufern kann durch einen Knock-Down von AML1/ETO mittels spezifischer siRNA wieder hergestellt werden (62). Eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung einer Leukämie ist der veränderten Transkription von AML1-Zielgenen durch das Fusionsprotein zuzuschreiben. AML1/ETO ist zwar notwendig aber allein nicht ausreichend für die Entstehung einer Leukämie. Wie in Tiermodellen gezeigt, werden noch zusätzliche Ereignisse bis zum Ausbruch der Leukämie benötigt (26, 96, 119, 190). Tiermodelle mit AML1/ETO exprimierenden hämatopoetischen Stammzellen zeigen zwar alle typischen Merkmale einer humanen Leukämie, wie z.B. eine erhöhte Anzahl an myeloiden Vorläufern, aber die Tiere entwickeln über einen langen Zeitraum hinweg keine Leukämie (26, 143). Versuche mit C-terminal trunkierten Formen von AML1/ETO geben Anlass zu der Annahme, dass der Verlust des C-Terminus, und somit das Fehlen der funktionellen Domänen NHR3 und 4, eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer Leukämie spielt (64, 186, 187). Tiere, die diese trunkierten Varianten von AML1/ETO exprimieren, entwickeln deutlich schneller eine AML. Somit stellt die trunkierte Form von AML1/ETO ein wesentlich stärkeres Onkogen im Mausmodell als das vollständige Fusionsprotein.

Die Aktivierung von Notch-Zielgenen durch AML1/ETO ist womöglich ein weiterer Schritt zur Entstehung einer Leukämie. Die aberrante Expression von Notch-Zielgenen durch AML1/ETO, die bei der normalen Myelopoese gehemmt wird, trägt zur Proliferation von myeloiden Vorläuferzellen bei und verhindert deren endgültige Differenzierung.

#### 5.5 Die Rolle der ETO-Familie im Notch-Signaltransduktionsweg

Die ETO-Familie ist artübergreifend in vielen Organismen vertreten. ETO-2, ein muriner Vertreter der ETO-Familie, und ETO (xl) aus *X. laevis* konnte *in vitro* und *in vivo* eine Interaktion mit SHARP nachgewiesen werden. Wie humanes ETO fungieren beide in funktionellen Experimenten als HDAC-abhängige Korepressoren zu SHARP. ETO-2 hemmt zusammen mit SHARP die Expression von HES1 und Hey1.

Zusammengenommen konnten Vertreter der ETO-Familie aus Mensch, Maus und Frosch als Teil von Repressorkomplexen an RBP-Jk identifiziert werden. Folglich könnten die ETO-Proteine eine neue Familie an potentiellen Repressorproteinen im Notch-Signaltransduktionsweg darstellen.

Allerdings ist zu beachten, dass nicht alle Mitglieder der ETO-Familie mit SHARP interagieren, wie das Beispiel XETOR aus X. laevis zeigt. Im Gegensatz zu ETO (xl) bindet XETOR weder an die SHARP-RD, noch ist es in funktionellen Experimenten in der Lage als Repressor zu fungieren. Damit wäre im gegensätzlichen Verhalten von XETOR zu den anderen untersuchten ETO-Proteinen ein Zusammenhang zwischen ihrem Bindeverhalten zur SHARP-RD und ihrer Funktion hergestellt. Nur über die Interaktion mit SHARP stellen ETO-Proteine funktionstüchtige Komponenten im Notch-Signaltransduktionsweg. Weshalb XETOR im Gegensatz zu ETO (xl) nicht an SHARP bindet muss noch geklärt werden. Obwohl im GST-Pull-Down mit der humanen SHARP-RD gearbeitet wurde, kann dies als Ursache für das unterschiedliche Bindeverhalten von XETOR und ETO (xl) ausgeschlossen werden, da X. laevis SHARP-RD und die humane SHARP-RD nahezu identisch sind (mündl. Mitteilung von PD Dr. F. Oswald). Die Gesamtproteinsequenz von XETOR ist nur zu 58 % identisch zu humanem ETO (Tab. 4.1). Trotzdem weisen die für die Interaktion verantwortlichen Domänen NHR1 und 2 von XETOR und humanem ETO eine sehr hohe Homologie auf (89,7 % bzw. 73,1 %) (Tab. 4.2/4.3). Es besteht dabei allerdings

die Möglichkeit, dass die bestehenden Unterschiede von XETOR NHR1 und 2 genau in den für die Interaktion verantwortlichen Aminosäuren innerhalb der beiden Domänen liegen, so dass keine XETOR/SHARP Interaktion mehr stattfinden kann. Diese Annahme müsste allerdings durch Interaktionsexperimente mit Mutanten der beiden Domänen überprüft werden.

Im Gegensatz zu ETO bindet ETO-2 zwar nicht an Sin3A, dafür interagiert es aber zusätzlich mit HDAC6 und HDAC8 (3). Der Mechanismus der Repressorfunktion von ETO-2 unterscheidet sich also geringfügig von dem des humanen ETO-Proteins durch die Bindung anderer Korepressoren (3). Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass auch andere Mitglieder der ETO-Familie an unterschiedliche Korepressoren binden. Durch die Bindung von verschiedenen ETO-Homologen an RBP-J $\kappa$ /SHARP könnte dies wiederum zu einer Rekrutierung unterschiedlicher Repressorkomplexe an Notch-Zielgene führen.

### 6. Zusammenfassung

Der Notch-Signaltransduktionsweg ist eine wichtige Instanz bei der Kontrolle von Entwicklungs- und Differenzierungsvorgängen in Invertebraten und Vertebraten. Sowohl bei den beteiligten Rezeptoren als auch den Liganden handelt es sich um Typ I Transmembranproteine. Dadurch ist die Kommunikation über diesen Signalweg auf benachbarte Zellen beschränkt. Die Bindung eines Liganden an einen Notch-Rezeptor löst einen zweistufigen Abspaltungsprozess der intrazellulären Domäne aus. Dieser Prozess wird durch spezifische Metalloproteasen und den  $\gamma$ -Sekretasekomplex katalysiert. Die durch den Spaltungsprozess freigesetzte intrazelluläre Domäne transloziert in den Zellkern und interagiert dort mit dem DNA-bindenden Transkriptionsfaktor RBP-J $\kappa$ . Unter Rekrutierung weiterer Koaktivatoren erfolgt anschließend die Transkription von Notch-Zielgenen.

In Abwesenheit der intrazellulären Domäne fungiert RBP-J $\kappa$  als transkriptioneller Repressor. Unterstützt wird diese Funktion von RBP-J $\kappa$  durch die Rekrutierung von HDAC-abhängigen Korepressorkomplexen. SHARP, ein Mitglied der Spen-Proteinfamilie, wurde als Teil eines solchen Repressorkomplexes identifiziert. SHARP interagiert zum einen direkt mit RBP-J $\kappa$ , zum anderen rekrutiert es über seine Repressionsdomäne HDACs und weitere HDAC-assoziierten Proteine.

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung neuer Kofaktoren des RBP-J $\kappa$ /SHARP-Komplexes. Dafür wurde zunächst das mit Hilfe eines Yeast-Two-Hybrid-Experiments identifizierte ETO-Protein als spezifisch SHARP-interagierender Faktor charakterisiert. Durch weitere Interaktionsexperimente und funktionelle Analysen von Mitgliedern der ETO-Familie konnten das murine ETO-2 und ETO (xl) aus dem Krallenfrosch *X. laevis* ebenfalls als SHARP interagierende Korepressoren identifiziert werden.

Bei der akuten myeloischen Leukämie (FAB M2) des Menschen ist ETO Ziel der chromosomalen Translokation t(8;22), die zur Expression des Fusionsproteins AML1/ETO führt.

GST-Pull-Down-Versuche und Immunpräzipitationen mit Deletionsmutanten ergaben, dass ETO und AML1/ETO über die funktionellen Domänen NHR1 und NHR2 mit der

Repressionsdomäne von SHARP interagieren. Die Reinigung endogener RBP-Jκ-Komplexe durch DNA-Affinitätschromatographie zeigte, dass ETO und AML1/ETO Teil dieser Komplexe sind. Im Gegensatz zu AML1/ETO verstärkt ETO die SHARPabhängige, transkriptionelle Repression von Notch-Zielgenen.

Ausgehend von den Daten dieser Arbeit kann ein Modell vorgeschlagen werden, dem, (A) **ETO-Proteine** neue Komponenten im RBP-J<sub>K</sub>/SHARP nach Korepressorkomplex (B) AML1/ETO darstellen und innerhalb des Korepressorkomplexes zur Aktivierung (oder Derepression) von Notch-Zielgenen führt.

Die vorliegende Arbeit zeigt demnach zum ersten Mal eine direkte Funktion des AML1/ETO Fusionsproteins bei der transkriptionellen Deregulation von Notch-Zielgenen. Diese Deregulation von Notch-Zielgenen durch AML1/ETO könnte bei Entstehung einer AML beteiligt sein.

## Abstract

The Notch signalling pathway plays a very important role during many developmental and differentiation processes.

Both Notch ligands and receptors are typ I transmembrane proteins. Ligand binding activates the cleavage of the intracellular domain of the Notch receptor mediated by metalloproteases and the  $\gamma$ -secretase complex. The released Notch intracellular domain (IC) translocates into the nucleus where it associates with the DNA-binding transcriptionfactor RBP-J $\kappa$ . Binding of Notch-IC to RBP-J $\kappa$  leads to the recruitment of further coactivators and to the transcriptional activation of notch target genes. In the absence of Notch-IC RBP-J $\kappa$  acts as a repressor of transcription through the recruitment of HDAC dependent corepressor complexes. A member of the spen family, SHARP, has been identified as a part of a RBP-J $\kappa$  repressor complex. SHARP interacts directly with RBP-J $\kappa$  and recruits HDACs and HDAC associated proteins to RBP-J $\kappa$ .

This study is about the characterisation of new RBP-Jκ/SHARP associated proteins. The corepressor ETO was found as a SHARP interacting protein in a yeast-twohybrid-screen. Further experiments identified the murine ETO-2 and *Xenopus laevis* ETO (xl), which are also part of the ETO family, as SHARP interacting proteins.

The chromosomal translocation t(8;21) is typical for the human acute myeloid leukaemia (FAB M2). It leads to the generation of the aberrant fusion protein AML1/ETO.

The functional domains NHR1 and NHR2 were identified as interaction interfaces between ETO (AML1/ETO) and SHARP as shown by GST-pull-down assays and immunoprecipitation experiments with deletionmutants of ETO. Purification of endogenous RBP-J $\kappa$  complexes by DNA affinity chromatography showed that ETO and AML1/ETO are part of these complexes. In contrast to AML1/ETO ETO enhances the SHARP dependent transcriptional repression of Notch target genes.

Regarding the results of this work it can be suggested that (A) ETO is a new component of the RBP-J $\kappa$ /SHARP repressor complex and (B) AML1/ETO in contrast to ETO leads to the activation or derepression of Notch target genes.

According to this it has been shown for the first time that AML1/ETO is directly involved in the deregulation of Notch target genes. This deregulating effect of AML1/ETO may contribute to the onset of AML.

## 7. Literaturverzeichnis

- 1. Ahn, M. Y., G. Huang, S. C. Bae, H. J. Wee, W. Y. Kim, and Y. Ito. 1998. Negative regulation of granulocytic differentiation in the myeloid precursor cell line 32Dcl3 by ear-2, a mammalian homolog of Drosophila seven-up, and a chimeric leukemogenic gene, AML1/ETO. Proc Natl Acad Sci U S A **95:**1812-7.
- Alcalay, M., N. Meani, V. Gelmetti, A. Fantozzi, M. Fagioli, A. Orleth, D. Riganelli, C. Sebastiani, E. Cappelli, C. Casciari, M. T. Sciurpi, A. R. Mariano, S. P. Minardi, L. Luzi, H. Muller, P. P. Di Fiore, G. Frosina, and P. G. Pelicci. 2003. Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. J Clin Invest 112:1751-61.
- Amann, J. M., J. Nip, D. K. Strom, B. Lutterbach, H. Harada, N. Lenny, J. R. Downing, S. Meyers, and S. W. Hiebert. 2001. ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain. Mol Cell Biol 21:6470-83.
- 4. **Ariyoshi, M., and J. W. Schwabe.** 2003. A conserved structural motif reveals the essential transcriptional repression function of Spen proteins and their role in developmental signaling. Genes Dev **17**:1909-20.
- 5. Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, and R. J. Lake. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science **284**:770-6.
- 6. **Bailey, A. M., and J. W. Posakony.** 1995. Suppressor of hairless directly activates transcription of enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. Genes Dev **9**:2609-22.
- 7. Banker, D. E., J. Radich, A. Becker, K. Kerkof, T. Norwood, C. Willman, and F. R. Appelbaum. 1998. The t(8;21) translocation is not consistently associated with high Bcl-2 expression in de novo acute myeloid leukemias of adults. Clin Cancer Res **4**:3051-62.
- Barseguian, K., B. Lutterbach, S. W. Hiebert, J. Nickerson, J. B. Lian, J. L. Stein, A. J. van Wijnen, and G. S. Stein. 2002. Multiple subnuclear targeting signals of the leukemia-related AML1/ETO and ETO repressor proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 99:15434-9.
- 9. Beatus, P., and U. Lendahl. 1998. Notch and neurogenesis. J Neurosci Res 54:125-36.
- 10. **Bigas, A., D. I. Martin, and L. A. Milner.** 1998. Notch1 and Notch2 inhibit myeloid differentiation in response to different cytokines. Mol Cell Biol **18**:2324-33.
- 11. Blaumueller, C. M., H. Qi, P. Zagouras, and S. Artavanis-Tsakonas. 1997. Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane. Cell **90**:281-91.
- 12. **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**:248-54.
- 13. **Bray, S.** 1998. Notch signalling in Drosophila: three ways to use a pathway. Semin Cell Dev Biol **9**:591-7.

- 14. **Bray, S., and M. Furriols.** 2001. Notch pathway: making sense of suppressor of hairless. Curr Biol **11:**R217-21.
- 15. **Bray, S. J.** 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. Nat Rev Mol Cell Biol **7:**678-89.
- 16. **Brennan, K., R. Tateson, K. Lewis, and A. M. Arias.** 1997. A functional analysis of Notch mutations in Drosophila. Genetics **147**:177-88.
- 17. Brou, C., F. Logeat, N. Gupta, C. Bessia, O. LeBail, J. R. Doedens, A. Cumano, P. Roux, R. A. Black, and A. Israel. 2000. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. Mol Cell 5:207-16.
- Brou, C., F. Logeat, M. Lecourtois, J. Vandekerckhove, P. Kourilsky, F. Schweisguth, and A. Israel. 1994. Inhibition of the DNA-binding activity of Drosophila suppressor of hairless and of its human homolog, KBF2/RBP-J kappa, by direct protein-protein interaction with Drosophila hairless. Genes Dev 8:2491-503.
- 19. Burel, S. A., N. Harakawa, L. Zhou, T. Pabst, D. G. Tenen, and D. E. Zhang. 2001. Dichotomy of AML1-ETO functions: growth arrest versus block of differentiation. Mol Cell Biol **21**:5577-90.
- 20. **Calabi, F., and V. Cilli.** 1998. CBFA2T1, a gene rearranged in human leukemia, is a member of a multigene family. Genomics **52**:332-41.
- 21. **Cao, Y., H. Zhao, and H. Grunz.** 2002. XETOR regulates the size of the proneural domain during primary neurogenesis in Xenopus laevis. Mech Dev **119:**35-44.
- 22. **Cayouette, M., and M. Raff.** 2002. Asymmetric segregation of Numb: a mechanism for neural specification from Drosophila to mammals. Nat Neurosci **5**:1265-9.
- 23. Chevallier, N., C. M. Corcoran, C. Lennon, E. Hyjek, A. Chadburn, V. J. Bardwell, J. D. Licht, and A. Melnick. 2004. ETO protein of t(8;21) AML is a corepressor for Bcl-6 B-cell lymphoma oncoprotein. Blood **103:**1454-63.
- 24. Christensen, S., V. Kodoyianni, M. Bosenberg, L. Friedman, and J. Kimble. 1996. lag-1, a gene required for lin-12 and glp-1 signaling in Caenorhabditis elegans, is homologous to human CBF1 and Drosophila Su(H). Development **122**:1373-83.
- 25. Davis, J. N., B. J. Williams, J. T. Herron, F. J. Galiano, and S. Meyers. 1999. ETO-2, a new member of the ETO-family of nuclear proteins. Oncogene **18**:1375-83.
- 26. de Guzman, C. G., A. J. Warren, Z. Zhang, L. Gartland, P. Erickson, H. Drabkin, S. W. Hiebert, and C. A. Klug. 2002. Hematopoietic stem cell expansion and distinct myeloid developmental abnormalities in a murine model of the AML1-ETO translocation. Mol Cell Biol **22**:5506-17.
- 27. De Strooper, B., W. Annaert, P. Cupers, P. Saftig, K. Craessaerts, J. S. Mumm, E. H. Schroeter, V. Schrijvers, M. S. Wolfe, W. J. Ray, A. Goate, and R. Kopan. 1999. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. Nature **398**:518-22.
- 28. **Deftos, M. L., and M. J. Bevan.** 2000. Notch signaling in T cell development. Curr Opin Immunol **12:**166-72.
- 29. Dou, S., X. Zeng, P. Cortes, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, T. Honjo, and L. D. Vales. 1994. The recombination signal sequence-binding protein RBP-2N functions as a transcriptional repressor. Mol Cell Biol **14**:3310-9.

- 30. **Downing, J. R.** 1999. The AML1-ETO chimaeric transcription factor in acute myeloid leukaemia: biology and clinical significance. Br J Haematol **106:**296-308.
- 31. Ellisen, L. W., J. Bird, D. C. West, A. L. Soreng, T. C. Reynolds, S. D. Smith, and J. Sklar. 1991. TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. Cell 66:649-61.
- 32. Elsasser, A., M. Franzen, A. Kohlmann, M. Weisser, S. Schnittger, C. Schoch, V. A. Reddy, S. Burel, D. E. Zhang, M. Ueffing, D. G. Tenen, W. Hiddemann, and G. Behre. 2003. The fusion protein AML1-ETO in acute myeloid leukemia with translocation t(8;21) induces c-jun protein expression via the proximal AP-1 site of the c-jun promoter in an indirect, JNK-dependent manner. Oncogene **22**:5646-57.
- 33. Era, T., N. Asou, T. Kunisada, H. Yamasaki, H. Asou, N. Kamada, S. Nishikawa, K. Yamaguchi, and K. Takatsuki. 1995. Identification of two transcripts of AML1/ETO-fused gene in t(8;21) leukemic cells and expression of wild-type ETO gene in hematopoietic cells. Genes Chromosomes Cancer 13:25-33.
- 34. Erickson, P. F., G. Dessev, R. S. Lasher, G. Philips, M. Robinson, and H. A. Drabkin. 1996. ETO and AML1 phosphoproteins are expressed in CD34+ hematopoietic progenitors: implications for t(8;21) leukemogenesis and monitoring residual disease. Blood 88:1813-23.
- 35. Erickson, P. F., M. Robinson, G. Owens, and H. A. Drabkin. 1994. The ETO portion of acute myeloid leukemia t(8;21) fusion transcript encodes a highly evolutionarily conserved, putative transcription factor. Cancer Res **54:**1782-6.
- 36. **Fehon, R. G., K. Johansen, I. Rebay, and S. Artavanis-Tsakonas.** 1991. Complex cellular and subcellular regulation of notch expression during embryonic and imaginal development of Drosophila: implications for notch function. J Cell Biol **113**:657-69.
- 37. Feinstein, P. G., K. Kornfeld, D. S. Hogness, and R. S. Mann. 1995. Identification of homeotic target genes in Drosophila melanogaster including nervy, a proto-oncogene homologue. Genetics **140:**573-86.
- 38. **Fields, S., and O. Song.** 1989. A novel genetic system to detect proteinprotein interactions. Nature **340**:245-6.
- 39. Fiuza, U. M., and A. M. Arias. 2007. Cell and molecular biology of Notch. J Endocrinol **194:**459-74.
- 40. **Fleming, R. J.** 1998. Structural conservation of Notch receptors and ligands. Semin Cell Dev Biol **9**:599-607.
- 41. **Fortini, M. E.** 2002. Gamma-secretase-mediated proteolysis in cell-surface-receptor signalling. Nat Rev Mol Cell Biol **3**:673-84.
- 42. **Fortini, M. E., and S. Artavanis-Tsakonas.** 1994. The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. Cell **79:**273-82.
- 43. **Fortini, M. E., I. Rebay, L. A. Caron, and S. Artavanis-Tsakonas.** 1993. An activated Notch receptor blocks cell-fate commitment in the developing Drosophila eye. Nature **365**:555-7.
- 44. **Fracchiolla, N. S., G. Colombo, P. Finelli, A. T. Maiolo, and A. Neri.** 1998. EHT, a new member of the MTG8/ETO gene family, maps on 20q11 region and is deleted in acute myeloid leukemias. Blood **92:**3481-4.

- 45. **Frank, R., J. Zhang, H. Uchida, S. Meyers, S. W. Hiebert, and S. D. Nimer.** 1995. The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B. Oncogene **11**:2667-74.
- 46. **Fryer, C. J., J. B. White, and K. A. Jones.** 2004. Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. Mol Cell **16**:509-20.
- 47. **Furriols, M., and S. Bray.** 2001. A model Notch response element detects Suppressor of Hairless-dependent molecular switch. Curr Biol **11**:60-4.
- 48. **Furukawa, T., M. Kawaichi, N. Matsunami, H. Ryo, Y. Nishida, and T. Honjo.** 1991. The Drosophila RBP-J kappa gene encodes the binding protein for the immunoglobulin J kappa recombination signal sequence. J Biol Chem **266:**23334-40.
- 49. **Furukawa, T., K. Kimura, Y. Kobayakawa, K. Tamura, M. Kawaichi, T. Tanimura, and T. Honjo.** 1994. Genetic characterization of Drosophila RBP-J kappa (suppressor of hairless) as a neurogenic gene in adult PNS development. Jpn J Genet **69:**701-11.
- 50. Gamou, T., E. Kitamura, F. Hosoda, K. Shimizu, K. Shinohara, Y. Hayashi, T. Nagase, Y. Yokoyama, and M. Ohki. 1998. The partner gene of AML1 in t(16;21) myeloid malignancies is a novel member of the MTG8(ETO) family. Blood **91:**4028-37.
- 51. Gelmetti, V., J. Zhang, M. Fanelli, S. Minucci, P. G. Pelicci, and M. A. Lazar. 1998. Aberrant recruitment of the nuclear receptor corepressor-histone deacetylase complex by the acute myeloid leukemia fusion partner ETO. Mol Cell Biol **18**:7185-91.
- 52. **Gerhart, J.** 1999. 1998 Warkany lecture: signaling pathways in development. Teratology **60:**226-39.
- 53. Goardon, N., J. A. Lambert, P. Rodriguez, P. Nissaire, S. Herblot, P. Thibault, D. Dumenil, J. Strouboulis, P. H. Romeo, and T. Hoang. 2006. ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. Embo J **25**:357-66.
- 54. Gottlieb, P. D., S. A. Pierce, R. J. Sims, H. Yamagishi, E. K. Weihe, J. V. Harriss, S. D. Maika, W. A. Kuziel, H. L. King, E. N. Olson, O. Nakagawa, and D. Srivastava. 2002. Bop encodes a muscle-restricted protein containing MYND and SET domains and is essential for cardiac differentiation and morphogenesis. Nat Genet **31**:25-32.
- 55. **Graham, F. L., and A. J. van der Eb.** 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. Virology **52:**456-67.
- 56. **Greenwald, I.** 1998. LIN-12/Notch signaling: lessons from worms and flies. Genes Dev **12**:1751-62.
- 57. **Gridley, T.** 2003. Notch signaling and inherited disease syndromes. Hum Mol Genet **12 Spec No 1:**R9-13.
- 58. **Gross, C. T., and W. McGinnis.** 1996. DEAF-1, a novel protein that binds an essential region in a Deformed response element. Embo J **15:**1961-70.
- 59. **Hamaguchi, Y., N. Matsunami, Y. Yamamoto, and T. Honjo.** 1989. Purification and characterization of a protein that binds to the recombination signal sequence of the immunoglobulin J kappa segment. Nucleic Acids Res **17:**9015-26.
- 60. Hamaguchi, Y., Y. Yamamoto, H. Iwanari, S. Maruyama, T. Furukawa, N. Matsunami, and T. Honjo. 1992. Biochemical and immunological characterization of the DNA binding protein (RBP-J kappa) to mouse J kappa recombination signal sequence. J Biochem **112:**314-20.

- 61. **Hartenstein, A. Y., A. Rugendorff, U. Tepass, and V. Hartenstein.** 1992. The function of the neurogenic genes during epithelial development in the Drosophila embryo. Development **116**:1203-20.
- 62. Heidenreich, O., J. Krauter, H. Riehle, P. Hadwiger, M. John, G. Heil, H. P. Vornlocher, and A. Nordheim. 2003. AML1/MTG8 oncogene suppression by small interfering RNAs supports myeloid differentiation of t(8;21)-positive leukemic cells. Blood **101:**3157-63.
- 63. **Heitzler, P., and P. Simpson.** 1991. The choice of cell fate in the epidermis of Drosophila. Cell **64:**1083-92.
- 64. **Hess, J. L., and B. A. Hug.** 2004. Fusion-protein truncation provides new insights into leukemogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A **101**:16985-6.
- 65. **Hildebrand, D., J. Tiefenbach, T. Heinzel, M. Grez, and A. B. Maurer.** 2001. Multiple regions of ETO cooperate in transcriptional repression. J Biol Chem **276**:9889-95.
- 66. **Honjo, T.** 1996. The shortest path from the surface to the nucleus: RBP-J kappa/Su(H) transcription factor. Genes Cells **1:**1-9.
- Hoogeveen, A. T., S. Rossetti, V. Stoyanova, J. Schonkeren, A. Fenaroli, L. Schiaffonati, L. van Unen, and N. Sacchi. 2002. The transcriptional corepressor MTG16a contains a novel nucleolar targeting sequence deranged in t (16; 21)-positive myeloid malignancies. Oncogene 21:6703-12.
- 68. Hsieh, J. J., T. Henkel, P. Salmon, E. Robey, M. G. Peterson, and S. D. Hayward. 1996. Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. Mol Cell Biol **16**:952-9.
- 69. Hsieh, J. J., S. Zhou, L. Chen, D. B. Young, and S. D. Hayward. 1999. CIR, a corepressor linking the DNA binding factor CBF1 to the histone deacetylase complex. Proc Natl Acad Sci U S A **96**:23-8.
- 70. Hug, B. A., and M. A. Lazar. 2004. ETO interacting proteins. Oncogene 23:4270-4.
- 71. **Iso, T., L. Kedes, and Y. Hamamori.** 2003. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. J Cell Physiol **194:**237-55.
- 72. Iso, T., V. Sartorelli, G. Chung, T. Shichinohe, L. Kedes, and Y. Hamamori. 2001. HERP, a new primary target of Notch regulated by ligand binding. Mol Cell Biol **21**:6071-9.
- 73. Jakubowiak, A., C. Pouponnot, F. Berguido, R. Frank, S. Mao, J. Massague, and S. D. Nimer. 2000. Inhibition of the transforming growth factor beta 1 signaling pathway by the AML1/ETO leukemia-associated fusion protein. J Biol Chem **275**:40282-7.
- 74. Jarriault, S., O. Le Bail, E. Hirsinger, O. Pourquie, F. Logeat, C. F. Strong,
  C. Brou, N. G. Seidah, and A. Isra I. 1998. Delta-1 activation of notch-1 signaling results in HES-1 transactivation. Mol Cell Biol 18:7423-31.
- Kao, H. Y., P. Ordentlich, N. Koyano-Nakagawa, Z. Tang, M. Downes, C. R. Kintner, R. M. Evans, and T. Kadesch. 1998. A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. Genes Dev 12:2269-77.
- 76. **Kasashima, K., E. Sakota, and T. Kozu.** 2004. Discrimination of target by siRNA: designing of AML1-MTG8 fusion mRNA-specific siRNA sequences. Biochimie **86:**713-21.
- 77. **Kidd, S., M. K. Baylies, G. P. Gasic, and M. W. Young.** 1989. Structure and distribution of the Notch protein in developing Drosophila. Genes Dev **3**:1113-29.

- 78. Kitabayashi, I., K. Ida, F. Morohoshi, A. Yokoyama, N. Mitsuhashi, K. Shimizu, N. Nomura, Y. Hayashi, and M. Ohki. 1998. The AML1-MTG8 leukemic fusion protein forms a complex with a novel member of the MTG8(ETO/CDR) family, MTGR1. Mol Cell Biol **18**:846-58.
- 79. Klampfer, L., J. Zhang, A. O. Zelenetz, H. Uchida, and S. D. Nimer. 1996. The AML1/ETO fusion protein activates transcription of BCL-2. Proc Natl Acad Sci U S A **93**:14059-64.
- 80. Kohzaki, H., K. Ito, G. Huang, H. J. Wee, Y. Murakami, and Y. Ito. 1999. Block of granulocytic differentiation of 32Dcl3 cells by AML1/ETO(MTG8) but not by highly expressed Bcl-2. Oncogene **18:**4055-62.
- 81. Kojika, S., and J. D. Griffin. 2001. Notch receptors and hematopoiesis. Exp Hematol **29:**1041-52.
- 82. Kopan, R., J. S. Nye, and H. Weintraub. 1994. The intracellular domain of mouse Notch: a constitutively activated repressor of myogenesis directed at the basic helix-loop-helix region of MyoD. Development **120**:2385-96.
- 83. Kopan, R., E. H. Schroeter, H. Weintraub, and J. S. Nye. 1996. Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. Proc Natl Acad Sci U S A **93**:1683-8.
- 84. **Koyano-Nakagawa, N., and C. Kintner.** 2005. The expression and function of MTG/ETO family proteins during neurogenesis. Dev Biol **278:**22-34.
- 85. Kuroda, K., H. Han, S. Tani, K. Tanigaki, T. Tun, T. Furukawa, Y. Taniguchi, H. Kurooka, Y. Hamada, S. Toyokuni, and T. Honjo. 2003. Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. Immunity **18:**301-12.
- 86. **Kurooka, H., and T. Honjo.** 2000. Functional interaction between the mouse notch1 intracellular region and histone acetyltransferases PCAF and GCN5. J Biol Chem **275**:17211-20.
- 87. **Kurooka, H., K. Kuroda, and T. Honjo.** 1998. Roles of the ankyrin repeats and C-terminal region of the mouse notch1 intracellular region. Nucleic Acids Res **26**:5448-55.
- 88. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-5.
- 89. Lamar, E., G. Deblandre, D. Wettstein, V. Gawantka, N. Pollet, C. Niehrs, and C. Kintner. 2001. Nrarp is a novel intracellular component of the Notch signaling pathway. Genes Dev **15**:1885-99.
- 90. Lausen, J., S. Cho, S. Liu, and M. H. Werner. 2004. The nuclear receptor co-repressor (N-CoR) utilizes repression domains I and III for interaction and co-repression with ETO. J Biol Chem **279:**49281-8.
- 91. Lazar, M. A. 2003. Nuclear receptor corepressors. Nucl Recept Signal 1:e001.
- 92. Lecourtois, M., and F. Schweisguth. 1995. The neurogenic suppressor of hairless DNA-binding protein mediates the transcriptional activation of the enhancer of split complex genes triggered by Notch signaling. Genes Dev 9:2598-608.
- 93. Levanon, D., V. Negreanu, Y. Bernstein, I. Bar-Am, L. Avivi, and Y. Groner. 1994. AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. Genomics **23**:425-32.
- 94. Lewis, J. 1996. Neurogenic genes and vertebrate neurogenesis. Curr Opin Neurobiol 6:3-10.
- 95. Licht, J. D. 2001. AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. Oncogene **20**:5660-79.
- 96. Licht, J. D., and D. W. Sternberg. 2005. The molecular pathology of acute myeloid leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program:137-42.
- 97. Lindberg, S. R., A. Olsson, A. M. Persson, and I. Olsson. 2003. Interactions between the leukaemia-associated ETO homologues of nuclear repressor proteins. Eur J Haematol **71:**439-47.
- 98. Linggi, B., C. Muller-Tidow, L. van de Locht, M. Hu, J. Nip, H. Serve, W. E. Berdel, B. van der Reijden, D. E. Quelle, J. D. Rowley, J. Cleveland, J. H. Jansen, P. P. Pandolfi, and S. W. Hiebert. 2002. The t(8;21) fusion protein, AML1 ETO, specifically represses the transcription of the p14(ARF) tumor suppressor in acute myeloid leukemia. Nat Med 8:743-50.
- 99. Logeat, F., C. Bessia, C. Brou, O. LeBail, S. Jarriault, N. G. Seidah, and A. Israel. 1998. The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. Proc Natl Acad Sci U S A **95**:8108-12.
- 100. Lutterbach, B., D. Sun, J. Schuetz, and S. W. Hiebert. 1998. The MYND motif is required for repression of basal transcription from the multidrug resistance 1 promoter by the t(8;21) fusion protein. Mol Cell Biol **18**:3604-11.
- 101. Lutterbach, B., J. J. Westendorf, B. Linggi, A. Patten, M. Moniwa, J. R. Davie, K. D. Huynh, V. J. Bardwell, R. M. Lavinsky, M. G. Rosenfeld, C. Glass, E. Seto, and S. W. Hiebert. 1998. ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, interacts with the N-CoR and mSin3 corepressors. Mol Cell Biol 18:7176-84.
- 102. **Ma, J., and M. Ptashne.** 1987. A new class of yeast transcriptional activators. Cell **51:**113-9.
- 103. **Ma, J., and M. Ptashne.** 1987. Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. Cell **48**:847-53.
- 104. **Maier, M. M., and M. Gessler.** 2000. Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes. Biochem Biophys Res Commun **275**:652-60.
- 105. **Maillard, I., T. Fang, and W. S. Pear.** 2005. Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. Annu Rev Immunol **23**:945-74.
- 106. **Matsunami, N., Y. Hamaguchi, Y. Yamamoto, K. Kuze, K. Kangawa, H. Matsuo, M. Kawaichi, and T. Honjo.** 1989. A protein binding to the J kappa recombination sequence of immunoglobulin genes contains a sequence related to the integrase motif. Nature **342**:934-7.
- 107. McGhee, L., J. Bryan, L. Elliott, H. L. Grimes, A. Kazanjian, J. N. Davis, and S. Meyers. 2003. Gfi-1 attaches to the nuclear matrix, associates with ETO (MTG8) and histone deacetylase proteins, and represses transcription using a TSA-sensitive mechanism. J Cell Biochem 89:1005-18.
- 108. McNeil, S., C. Zeng, K. S. Harrington, S. Hiebert, J. B. Lian, J. L. Stein, A. J. van Wijnen, and G. S. Stein. 1999. The t(8;21) chromosomal translocation in acute myelogenous leukemia modifies intranuclear targeting of the AML1/CBFalpha2 transcription factor. Proc Natl Acad Sci U S A 96:14882-7.
- 109. Melnick, A. M., J. J. Westendorf, A. Polinger, G. W. Carlile, S. Arai, H. J. Ball, B. Lutterbach, S. W. Hiebert, and J. D. Licht. 2000. The ETO protein disrupted in t(8;21)-associated acute myeloid leukemia is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. Mol Cell Biol **20**:2075-86.
- 110. **Meyers, S., J. R. Downing, and S. W. Hiebert.** 1993. Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA-

binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions. Mol Cell Biol **13:**6336-45.

- 111. **Meyers, S., N. Lenny, and S. W. Hiebert.** 1995. The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation. Mol Cell Biol **15**:1974-82.
- 112. **Milner, L. A., A. Bigas, R. Kopan, C. Brashem-Stein, I. D. Bernstein, and D. I. Martin.** 1996. Inhibition of granulocytic differentiation by mNotch1. Proc Natl Acad Sci U S A **93:**13014-9.
- 113. Minucci, S., G. De Rienzo, R. Di Sena, G. Cobellis, R. Meccariello, R. Pierantoni, and S. Fasano. 2000. Effects of multiple injections of ethane 1,2dimethane sulphonate (EDS) on the frog, Rana esculenta, testicular activity. J Exp Zool 287:384-93.
- 114. **Miyoshi, H., T. Kozu, K. Shimizu, K. Enomoto, N. Maseki, Y. Kaneko, N. Kamada, and M. Ohki.** 1993. The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript. Embo J **12:**2715-21.
- 115. **Mohr, O. L.** 1919. Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in Drosophila. Genetics **4**:275-82.
- 116. Moloney, D. J., V. M. Panin, S. H. Johnston, J. Chen, L. Shao, R. Wilson, Y. Wang, P. Stanley, K. D. Irvine, R. S. Haltiwanger, and T. F. Vogt. 2000. Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. Nature 406:369-75.
- 117. Morel, V., M. Lecourtois, O. Massiani, D. Maier, A. Preiss, and F. Schweisguth. 2001. Transcriptional repression by suppressor of hairless involves the binding of a hairless-dCtBP complex in Drosophila. Curr Biol 11:789-92.
- 118. Morohoshi, F., S. Mitani, N. Mitsuhashi, I. Kitabayashi, E. Takahashi, M. Suzuki, N. Munakata, and M. Ohki. 2000. Structure and expression pattern of a human MTG8/ETO family gene, MTGR1. Gene **241**:287-95.
- 119. Mulloy, J. C., J. Cammenga, K. L. MacKenzie, F. J. Berguido, M. A. Moore, and S. D. Nimer. 2002. The AML1-ETO fusion protein promotes the expansion of human hematopoietic stem cells. Blood **99**:15-23.
- 120. **Mumm, J. S., and R. Kopan.** 2000. Notch signaling: from the outside in. Dev Biol **228:**151-65.
- 121. Murre, C., G. Bain, M. A. van Dijk, I. Engel, B. A. Furnari, M. E. Massari, J. R. Matthews, M. W. Quong, R. R. Rivera, and M. H. Stuiver. 1994. Structure and function of helix-loop-helix proteins. Biochim Biophys Acta **1218**:129-35.
- 122. **Newberry, E. P., T. Latifi, and D. A. Towler.** 1999. The RRM domain of MINT, a novel Msx2 binding protein, recognizes and regulates the rat osteocalcin promoter. Biochemistry **38**:10678-90.
- 123. Odaka, Y., A. Mally, L. T. Elliott, and S. Meyers. 2000. Nuclear import and subnuclear localization of the proto-oncoprotein ETO (MTG8). Oncogene 19:3584-97.
- 124. Ogawa, E., M. Inuzuka, M. Maruyama, M. Satake, M. Naito-Fujimoto, Y. Ito, and K. Shigesada. 1993. Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel Drosophila runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha. Virology **194**:314-31.
- 125. Ogawa, E., M. Maruyama, H. Kagoshima, M. Inuzuka, J. Lu, M. Satake, K. Shigesada, and Y. Ito. 1993. PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the Drosophila runt gene and the human AML1 gene. Proc Natl Acad Sci U S A **90**:6859-63.

- 126. Ogryzko, V. V., R. L. Schiltz, V. Russanova, B. H. Howard, and Y. Nakatani. 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. Cell **87**:953-9.
- 127. **Ohishi, K., N. Katayama, H. Shiku, B. Varnum-Finney, and I. D. Bernstein.** 2003. Notch signalling in hematopoiesis. Semin Cell Dev Biol **14:**143-50.
- 128. Ohtsuka, T., M. Ishibashi, G. Gradwohl, S. Nakanishi, F. Guillemot, and R. Kageyama. 1999. Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. Embo J 18:2196-207.
- 129. Okuda, T., Z. Cai, S. Yang, N. Lenny, C. J. Lyu, J. M. van Deursen, H. Harada, and J. R. Downing. 1998. Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors. Blood **91**:3134-43.
- 130. **Okuda, T., J. van Deursen, S. W. Hiebert, G. Grosveld, and J. R. Downing.** 1996. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. Cell **84:**321-30.
- 131. Olave, I., D. Reinberg, and L. D. Vales. 1998. The mammalian transcriptional repressor RBP (CBF1) targets TFIID and TFIIA to prevent activated transcription. Genes Dev **12**:1621-37.
- Oswald, F., U. Kostezka, K. Astrahantseff, S. Bourteele, K. Dillinger, U. Zechner, L. Ludwig, M. Wilda, H. Hameister, W. Knochel, S. Liptay, and R. M. Schmid. 2002. SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jkappa signalling pathway. Embo J 21:5417-26.
- 133. Oswald, F., B. Tauber, T. Dobner, S. Bourteele, U. Kostezka, G. Adler, S. Liptay, and R. M. Schmid. 2001. p300 acts as a transcriptional coactivator for mammalian Notch-1. Mol Cell Biol 21:7761-74.
- 134. Oswald, F., M. Winkler, Y. Cao, K. Astrahantseff, S. Bourteele, W. Knochel, and T. Borggrefe. 2005. RBP-Jkappa/SHARP recruits CtIP/CtBP corepressors to silence Notch target genes. Mol Cell Biol **25**:10379-90.
- 135. **Palka, J., M. Schubiger, and H. Schwaninger.** 1990. Neurogenic and antineurogenic effects from modifications at the Notch locus. Development **109:**167-75.
- 136. Peterson, L. F., A. Boyapati, E. Y. Ahn, J. R. Biggs, A. Joo Okumura, M. C. Lo, M. Yan, and D. E. Zhang. 2007. Acute myeloid leukemia with the 8q22;21q22 translocation: secondary mutational events and alternative t(8;21) transcripts. Blood.
- 137. **Peterson, L. F., M. Yan, and D. E. Zhang.** 2007. The p21Waf1 pathway is involved in blocking leukemogenesis by the t(8;21) fusion protein AML1-ETO. Blood **109:**4392-8.
- 138. **Peterson, L. F., and D. E. Zhang.** 2004. The 8;21 translocation in leukemogenesis. Oncogene **23**:4255-62.
- 139. **Poulson, D. F.** 1937. Chromosomal Deficiencies and the Embryonic Development of Drosophila Melanogaster. Proc Natl Acad Sci U S A **23**:133-7.
- 140. Radtke, F., F. Schweisguth, and W. Pear. 2005. The Notch 'gospel'. EMBO Rep 6:1120-5.
- 141. Rand, M. D., L. M. Grimm, S. Artavanis-Tsakonas, V. Patriub, S. C. Blacklow, J. Sklar, and J. C. Aster. 2000. Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric notch receptors. Mol Cell Biol **20**:1825-35.
- 142. Rangarajan, A., C. Talora, R. Okuyama, M. Nicolas, C. Mammucari, H. Oh, J. C. Aster, S. Krishna, D. Metzger, P. Chambon, L. Miele, M. Aguet, F.

**Radtke, and G. P. Dotto.** 2001. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. Embo J **20**:3427-36.

- 143. Rhoades, K. L., C. J. Hetherington, N. Harakawa, D. A. Yergeau, L. Zhou, L. Q. Liu, M. T. Little, D. G. Tenen, and D. E. Zhang. 2000. Analysis of the role of AML1-ETO in leukemogenesis, using an inducible transgenic mouse model. Blood 96:2108-15.
- 144. Rhoades, K. L., C. J. Hetherington, J. D. Rowley, S. W. Hiebert, G. Nucifora, D. G. Tenen, and D. E. Zhang. 1996. Synergistic up-regulation of the myeloid-specific promoter for the macrophage colony-stimulating factor receptor by AML1 and the t(8;21) fusion protein may contribute to leukemogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A **93**:11895-900.
- 145. **Rooke, J., D. Pan, T. Xu, and G. M. Rubin.** 1996. KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in Drosophila neurogenesis. Science **273**:1227-31.
- 146. **Rossetti, S., A. T. Hoogeveen, and N. Sacchi.** 2004. The MTG proteins: chromatin repression players with a passion for networking. Genomics **84:**1-9.
- 147. Roy, M., W. S. Pear, and J. C. Aster. 2007. The multifaceted role of Notch in cancer. Curr Opin Genet Dev 17:52-9.
- 148. Sacchi, N., F. Tamanini, R. Willemsen, S. Denis-Donini, S. Campiglio, and A. T. Hoogeveen. 1998. Subcellular localization of the oncoprotein MTG8 (CDR/ETO) in neural cells. Oncogene **16**:2609-15.
- 149. Sakai, T., T. Furukawa, H. Iwanari, C. Oka, T. Nakano, M. Kawaichi, and T. Honjo. 1995. Loss of immunostaining of the RBP-J kappa transcription factor upon F9 cell differentiation induced by retinoic acid. J Biochem 118:621-8.
- 150. Salat, D., R. Liefke, J. Wiedenmann, T. Borggrefe, and F. Oswald. 2008. ETO, but not leukemogenic fusion protein AML1/ETO, augments RBP-Jkappa/SHARP-mediated repression of notch target genes. Mol Cell Biol 28:3502-12.
- 151. Sastre, M., H. Steiner, K. Fuchs, A. Capell, G. Multhaup, M. M. Condron, D. B. Teplow, and C. Haass. 2001. Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. EMBO Rep 2:835-41.
- 152. Schroeter, E. H., J. A. Kisslinger, and R. Kopan. 1998. Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. Nature **393**:382-6.
- 153. Schuh, A. H., A. J. Tipping, A. J. Clark, I. Hamlett, B. Guyot, F. J. Iborra, P. Rodriguez, J. Strouboulis, T. Enver, P. Vyas, and C. Porcher. 2005. ETO-2 associates with SCL in erythroid cells and megakaryocytes and provides repressor functions in erythropoiesis. Mol Cell Biol 25:10235-50.
- 154. **Schweisguth, F.** 2004. Regulation of notch signaling activity. Curr Biol **14:**R129-38.
- 155. Shi, Y., M. Downes, W. Xie, H. Y. Kao, P. Ordentlich, C. C. Tsai, M. Hon, and R. M. Evans. 2001. Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation. Genes Dev **15**:1140-51.
- 156. Shikami, M., H. Miwa, K. Nishii, T. Takahashi, T. Sekine, N. Mahmud, M. Nishikawa, H. Shiku, N. Kamada, and K. Kita. 1999. Low BCL-2 expression in acute leukemia with t(8;21) chromosomal abnormality. Leukemia **13**:358-68.
- 157. Shimizu, K., I. Kitabayashi, N. Kamada, T. Abe, N. Maseki, K. Suzukawa, and M. Ohki. 2000. AML1-MTG8 leukemic protein induces the expression of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor through the upregulation of CCAAT/enhancer binding protein epsilon. Blood **96:**288-96.

- 158. **Spadaccini, R., H. Perrin, M. J. Bottomley, S. Ansieau, and M. Sattler.** 2006. Structure and functional analysis of the MYND domain. J Mol Biol **358**:498-508.
- 159. **Speck, N. A.** 2001. Core binding factor and its role in normal hematopoietic development. Curr Opin Hematol **8**:192-6.
- 160. **Struhl, G., K. Fitzgerald, and I. Greenwald.** 1993. Intrinsic activity of the Lin-12 and Notch intracellular domains in vivo. Cell **74:**331-45.
- 161. **Struhl, K.** 1998. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. Genes Dev **12**:599-606.
- 162. **Tamura, K., Y. Taniguchi, S. Minoguchi, T. Sakai, T. Tun, T. Furukawa, and T. Honjo.** 1995. Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor RBP-J kappa/Su(H). Curr Biol **5**:1416-23.
- 163. Tanaka, K., T. Tanaka, M. Kurokawa, Y. Imai, S. Ogawa, K. Mitani, Y. Yazaki, and H. Hirai. 1998. The AML1/ETO(MTG8) and AML1/Evi-1 leukemia-associated chimeric oncoproteins accumulate PEBP2beta(CBFbeta) in the nucleus more efficiently than wild-type AML1. Blood **91**:1688-99.
- 164. **Taniguchi, Y., T. Furukawa, T. Tun, H. Han, and T. Honjo.** 1998. LIM protein KyoT2 negatively regulates transcription by association with the RBP-J DNA-binding protein. Mol Cell Biol **18**:644-54.
- 165. **Tighe, J. E., and F. Calabi.** 1995. t(8;21) breakpoints are clustered between alternatively spliced exons of MTG8. Clin Sci (Lond) **89:**215-8.
- 166. **Tighe, J. É., A. Daga, and F. Calabi.** 1993. Translocation breakpoints are clustered on both chromosome 8 and chromosome 21 in the t(8;21) of acute myeloid leukemia. Blood **81:**592-6.
- 167. Tonks, A., L. Pearn, A. J. Tonks, L. Pearce, T. Hoy, S. Phillips, J. Fisher, J. R. Downing, A. K. Burnett, and R. L. Darley. 2003. The AML1-ETO fusion gene promotes extensive self-renewal of human primary erythroid cells. Blood 101:624-32.
- 168. **Tun, T., Y. Hamaguchi, N. Matsunami, T. Furukawa, T. Honjo, and M. Kawaichi.** 1994. Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa. Nucleic Acids Res **22**:965-71.
- 169. Varnum-Finney, B., L. E. Purton, M. Yu, C. Brashem-Stein, D. Flowers, S. Staats, K. A. Moore, I. Le Roux, R. Mann, G. Gray, S. Artavanis-Tsakonas, and I. D. Bernstein. 1998. The Notch ligand, Jagged-1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells. Blood 91:4084-91.
- 170. Vasyutina, E., D. C. Lenhard, and C. Birchmeier. 2007. Notch function in myogenesis. Cell Cycle 6:1451-4.
- 171. Wallberg, A. E., K. Pedersen, U. Lendahl, and R. G. Roeder. 2002. p300 and PCAF act cooperatively to mediate transcriptional activation from chromatin templates by notch intracellular domains in vitro. Mol Cell Biol 22:7812-9.
- 172. Wang, J., T. Hoshino, R. L. Redner, S. Kajigaya, and J. M. Liu. 1998. ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. Proc Natl Acad Sci U S A **95**:10860-5.
- 173. Wang, Q., T. Stacy, J. D. Miller, A. F. Lewis, T. L. Gu, X. Huang, J. H. Bushweller, J. C. Bories, F. W. Alt, G. Ryan, P. P. Liu, A. Wynshaw-Boris, M. Binder, M. Marin-Padilla, A. H. Sharpe, and N. A. Speck. 1996. The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo. Cell 87:697-708.

- 174. **Weinmaster, G.** 1998. Notch signaling: direct or what? Curr Opin Genet Dev **8:**436-42.
- 175. Weng, A. P., J. M. Millholland, Y. Yashiro-Ohtani, M. L. Arcangeli, A. Lau, C. Wai, C. Del Bianco, C. G. Rodriguez, H. Sai, J. Tobias, Y. Li, M. S. Wolfe, C. Shachaf, D. Felsher, S. C. Blacklow, W. S. Pear, and J. C. Aster. 2006. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. Genes Dev 20:2096-109.
- 176. Westendorf, J. J., C. M. Yamamoto, N. Lenny, J. R. Downing, M. E. Selsted, and S. W. Hiebert. 1998. The t(8;21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP-alpha, inhibits C/EBP-alpha-dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. Mol Cell Biol **18**:322-33.
- 177. Wharton, K. A., B. Yedvobnick, V. G. Finnerty, and S. Artavanis-Tsakonas. 1985. opa: a novel family of transcribed repeats shared by the Notch locus and other developmentally regulated loci in D. melanogaster. Cell 40:55-62.
- 178. Wiedenmann, J., A. Schenk, C. Rocker, A. Girod, K. D. Spindler, and G. U. Nienhaus. 2002. A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from Entacmaea quadricolor (Anthozoa, Actinaria). Proc Natl Acad Sci U S A 99:11646-51.
- 179. **Wildonger, J., and R. S. Mann.** 2005. Evidence that nervy, the Drosophila homolog of ETO/MTG8, promotes mechanosensory organ development by enhancing Notch signaling. Dev Biol **286**:507-20.
- 180. Wolford, J. K., and M. Prochazka. 1998. Structure and expression of the human MTG8/ETO gene. Gene **212**:103-9.
- 181. Wood, J. D., F. C. Nucifora, Jr., K. Duan, C. Zhang, J. Wang, Y. Kim, G. Schilling, N. Sacchi, J. M. Liu, and C. A. Ross. 2000. Atrophin-1, the dentato-rubral and pallido-luysian atrophy gene product, interacts with ETO/MTG8 in the nuclear matrix and represses transcription. J Cell Biol 150:939-48.
- 182. Wu, G., S. Lyapina, I. Das, J. Li, M. Gurney, A. Pauley, I. Chui, R. J. Deshaies, and J. Kitajewski. 2001. SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. Mol Cell Biol 21:7403-15.
- 183. **Wu, J. Y., and Y. Rao.** 1999. Fringe: defining borders by regulating the notch pathway. Curr Opin Neurobiol **9**:537-43.
- 184. Wu, L., J. C. Aster, S. C. Blacklow, R. Lake, S. Artavanis-Tsakonas, and J. D. Griffin. 2000. MAML1, a human homologue of Drosophila mastermind, is a transcriptional co-activator for NOTCH receptors. Nat Genet 26:484-9.
- 185. Xu, T., L. A. Caron, R. G. Fehon, and S. Artavanis-Tsakonas. 1992. The involvement of the Notch locus in Drosophila oogenesis. Development **115**:913-22.
- 186. Yan, M., S. A. Burel, L. F. Peterson, E. Kanbe, H. Iwasaki, A. Boyapati, R. Hines, K. Akashi, and D. E. Zhang. 2004. Deletion of an AML1-ETO C-terminal NcoR/SMRT-interacting region strongly induces leukemia development. Proc Natl Acad Sci U S A 101:17186-91.
- 187. Yan, M., E. Kanbe, L. F. Peterson, A. Boyapati, Y. Miao, Y. Wang, I. M. Chen, Z. Chen, J. D. Rowley, C. L. Willman, and D. E. Zhang. 2006. A previously unidentified alternatively spliced isoform of t(8;21) transcript promotes leukemogenesis. Nat Med **12**:945-9.

- 188. Yang, L. T., J. T. Nichols, C. Yao, J. O. Manilay, E. A. Robey, and G. Weinmaster. 2005. Fringe glycosyltransferases differentially modulate Notch1 proteolysis induced by Delta1 and Jagged1. Mol Biol Cell 16:927-42.
- 189. Yergeau, D. A., C. J. Hetherington, Q. Wang, P. Zhang, A. H. Sharpe, M. Binder, M. Marin-Padilla, D. G. Tenen, N. A. Speck, and D. E. Zhang. 1997. Embryonic lethality and impairment of haematopoiesis in mice heterozygous for an AML1-ETO fusion gene. Nat Genet 15:303-6.
- 190. Yuan, Y., L. Zhou, T. Miyamoto, H. Iwasaki, N. Harakawa, C. J. Hetherington, S. A. Burel, E. Lagasse, I. L. Weissman, K. Akashi, and D. E. Zhang. 2001. AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. Proc Natl Acad Sci U S A 98:10398-403.
- 191. Zhang, J., B. A. Hug, E. Y. Huang, C. W. Chen, V. Gelmetti, M. Maccarana, S. Minucci, P. G. Pelicci, and M. A. Lazar. 2001. Oligomerization of ETO is obligatory for corepressor interaction. Mol Cell Biol 21:156-63.
- 192. Zhou, S., M. Fujimuro, J. J. Hsieh, L. Chen, and S. D. Hayward. 2000. A role for SKIP in EBNA2 activation of CBF1-repressed promoters. J Virol **74**:1939-47.
- 193. Zhou, S., M. Fujimuro, J. J. Hsieh, L. Chen, A. Miyamoto, G. Weinmaster, and S. D. Hayward. 2000. SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of NotchIC To facilitate NotchIC function. Mol Cell Biol **20**:2400-10.
- 194. **Zhou, S., and S. D. Hayward.** 2001. Nuclear localization of CBF1 is regulated by interactions with the SMRT corepressor complex. Mol Cell Biol **21:**6222-32.

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K.-D. Spindler als meinen Doktorvater für die Übernahme des 1. Gutachtens bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. W. Knöchel für die Übernahme des 2. Gutachtens.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. Franz Oswald für die Bereitstellung dieser Doktorarbeit, die Betreuung und die tatkräftige Unterstützung.

Vielen Dank den netten Mädels vom Labor. Ich konnte mich immer auf eure Hilfe und Unterstützung verlassen. Danke für die liebe Aufnahme in die Gruppe und dafür, dass ich immer auf euch zählen konnte.

Ein weiterer Dank gilt auch Dr. T. Borggrefe für die gute Zusammenarbeit.

Als letztes möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie, Christoph und Susanne bedanken. Für die Geduld, die Unterstützung, das Vertrauen, das ihr mir während der letzten neun Jahre entgegengebracht habt. Christoph, danke dass du immer an mich geglaubt hast. Susanne, danke für deine Freundschaft.

Ich erkläre hiermit, dass diese Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt wurde. Alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen wurden, sind durch Angabe der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht worden.

Ulm, den \_\_\_\_\_

Daniela Salat

## Publikation

Salat, D., R. Liefke, J. Wiedenmann, T. Borggrefe, and F. Oswald. 2008. ETO, but not leukemogenic fusion protein AML1/ETO, augments RBP-Jkappa/SHARPmediated repression of notch target genes. Mol Cell Biol **28**:3502-12.