

JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ



TBX3-Mutationsanalysen und Konstruktion einer Zelllinie für TBX2-Inhibitorscreenings

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Kathrin Fischer

geb. am 15. September 1982 in Zell-Barl

Mainz, 2015

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	1
2	Zusammenfassung	3
3	Einleitung	5
3.1	Die T-box-Genfamilie	5
3.2	Die Tbx2-Unterfamilie	7
3.3	Kanzerogenese	9
3.4	Die Rolle von Treibermutationen für die Kanzerogenese	10
3.5	TBX2/TBX3 und Krebs	10
3.6	Posttranslationale Modifikation von Proteinen	14
3.6.1	Phosphorylierung	15
3.6.2	SUMOylierung	16
3.7	Co-Repressoren	18
3.7.1	Die Groucho/TLE-Genfamilie	18
3.7.2	Die Genfamilie der C-terminalen Binde Proteine	20
3.8	Traditionelle chinesische Medizin zur gezielten Bekämpfung von Krebs . . .	21
3.9	Reportergenassays	22
3.10	Grün Fluoreszierendes Protein	23
3.11	Identifizierung pharmakologisch aktiver Substanzen im Hochdurchsatz- screening	24
3.12	Tet-On 3G-System zur induzierbaren Genexpression	25
4	Zielsetzung	27

5	Material und Methoden	29
5.1	Chemikalien, Stimulanzen und Kits	29
5.2	Kulturmedien, Puffer und Lösungen	31
5.3	Geräte	33
5.4	Verbrauchsmaterial	34
5.5	Enzyme	35
5.5.1	Restriktionsenzyme	35
5.5.2	Sonstige Enzyme	36
5.6	Antikörper	36
5.6.1	Primäre Antikörper	36
5.6.2	Sekundäre Antikörper	36
5.7	Bakterienstämme	36
5.8	Vektoren	37
5.8.1	Entry-Vektoren	37
5.8.2	Destinations-Vektoren	37
5.8.3	Sonstige Vektoren	38
5.9	Primer	39
5.9.1	Zur Mutagenese verwendete Primer	39
5.9.2	Zur Herstellung von Konstrukten verwendete Primer	41
5.9.3	Zur Sequenzierung verwendete Primer	41
5.9.4	Zur qPCR verwendete Primer	42
5.10	Mikrobiologische Methoden	42
5.10.1	Chemische Hitzeschock-Transformation von Bakterien	42
5.10.2	Kultivierung von Bakterien	42
5.10.3	Glycerin-Dauerkulturen zur Konservierung von Bakterien	43
5.11	Molekularbiologische Methoden	43
5.11.1	Polymerasekettenreaktion	43
5.11.1.1	Standard-PCR	43
5.11.1.2	Linker-PCR	44
5.11.1.3	Mutagenese-PCR	44
5.11.1.4	Mykoplasmen-PCR	44
5.11.2	Aufreinigung von PCR-Produkten	46

5.11.3	Agarosegelelektrophorese	46
5.11.4	Gelextraktion	46
5.11.5	Restriktionsverdau	47
5.11.6	Ligation	47
5.11.7	LR-Rekombination	47
5.11.8	In-Fusion-Cloning	48
5.11.9	Isolierung von Plasmid-DNA	48
5.11.9.1	Manuelle Plasmidpräparation	48
5.11.9.2	Kommerzielle Plasmidpräparation	49
5.11.10	Phenol-Chloroform-Extraktion	49
5.11.11	Ethanolische Fällung von Nukleinsäuren	49
5.11.12	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	50
5.11.13	Sequenzierung	50
5.11.14	RNA-Isolierung	50
5.11.15	cDNA-Synthese	51
5.11.16	Quantitative Real-Time PCR	51
5.12	Zellbiologische Methoden	52
5.12.1	Kultivierung von Säugerzellen	52
5.12.2	Passagieren von adhärennten Säugerzellen	52
5.12.3	Bestimmung der Zellzahl mit der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	53
5.12.4	Kryokonservierung und Auftauen von Säugerzellen	53
5.12.5	Transfektion von Säugerzellen	54
5.12.5.1	Transiente Transfektion	54
5.12.5.2	Stabile Transfektion	55
5.12.6	Luciferase-Reportergenassay	56
5.12.7	Induktion mit Doxyzyklin	57
5.12.8	Überprüfung der Proteininstabilität mittels CHX	57
5.12.9	Durchflusszytometrie	57
5.13	Proteinbiochemische Methoden	58
5.13.1	Herstellung von Zelllysaten für SDS-PAGE und Western Blot	58
5.13.2	Bradford-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration	58

5.13.3	Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	59
5.13.3.1	Natives Gel	59
5.13.3.2	SDS-PAGE	59
5.13.4	Western Blot	60
5.13.5	Immundetektion der Proteine	61
5.13.6	Entfernen von Antikörpern	61
5.13.7	Proteinexpression in <i>E. coli</i> -Stamm BL21-DE3	62
5.13.8	Proteinaufreinigung mittels GST-Affinitätschromatographie	62
5.13.9	Elektromobility Shift Assay	63
5.13.10	Pixellichtanalyse	64
5.14	Auswertung und statistische Analyse	64
5.14.1	Normalisierung der Repression auf die Proteinkonzentration	64
5.15	Proteinsequenzen der TBX-Faktoren	65
6	Ergebnisse	67
6.1	Herstellung der Vektorkonstrukte	67
6.1.1	Herstellung von Vektorkonstrukten zur Expression von mutanten TBX2/3-Varianten in Säugerzellen	67
6.1.2	Herstellung der TBX3 1-342/pGEX2TK-Konstrukte zur bakteriellen Proteinexpression in <i>E. coli</i>	68
6.1.3	Herstellung des p21-GLuc-Reportergenvektors	69
6.1.4	Herstellung des p21-FLuc-Reportergenvektors	70
6.1.5	Herstellung des pTRE3G-TBX2-Expressionsvektors zur Dox-indu- zierten TBX2-Expression	71
6.1.6	Generierung des p21-d2EGFP-Reportergenvektors	72
6.2	Analyse potentieller TBX3-Treibermutanten	74
6.2.1	Aminosäurekonservierung potentieller TBX3-Treibermutationen	74
6.2.2	Herstellung und Isolation der GST-TBX3 1-342aa-Fusionsproteine	75
6.2.3	Die DNA-Bindung treibermutanter TBX3-Proteine	77
6.2.4	Einfluss treibermutanter TBX3-Proteine auf die p21-Regulation im Reportergentest	78

6.2.5	Einfluss treibermutanter TBX3-Proteine auf die p21-Regulation im Dual-Reportergentest	79
6.2.6	Reportergen-Repression in transfizierten Zellen: Die Rolle der DNA-Bindung	80
6.2.7	Repression des Reportergens in transfizierten Zellen: Der Effekt potentieller TBX3-Treibermutationen	82
6.2.8	Die Repression der endogenen <i>p21</i> -Expression durch TBX3 und seiner Treibermutanten	84
6.2.9	Differentielle Expression der mutanten TBX3-Proteine	85
6.2.10	Von TBX3/pT-REx-DEST30-Expressionsvektoren regulierte <i>TBX3</i> -Expression	87
6.2.11	Statistische Analyse somatischer <i>TBX3</i> -Mutationen in humanen Krebsgeweben	87
6.3	Analyse von TBX3-Funktions-/Interaktionsmutanten	92
6.3.1	Die dephosphomimetische TBX3-Mutante S674A	92
6.3.2	Die potentielle SUMOylierungs-Mutante D275K	92
6.3.3	Die potentielle dominant-negative TBX3-Mutante Y149S	93
6.3.4	Die Rb1-Interaktionsmutante M302A/V304A	94
6.3.5	Einfluss der TBX3-Funktions-/Interaktionsmutanten auf die Regulation des p21-Promotors	95
6.3.6	Der Einfluss von Co-Repressoren auf die TBX3-abhängige p21-Regulation	98
6.4	Generierung einer Zelllinie als Screeningsystem zur Identifizierung TBX2-inhibierender Wirkstoffe	102
6.4.1	Konzeption	102
6.4.2	Bestimmung der optimalen Doxyzyklin-Konzentration zur induzierten Genexpression	104
6.4.3	Die p21-Repression des Dox-induzierten TBX2-Proteins	105
6.4.4	Schritt 1: die stabile, Tet-On 3G-exprimierende Zelllinie	107
6.4.5	Schritt 2: die stabile Zelllinie mit konstitutiver Tet-On 3G-Expression und Dox-induzierbarer TBX2-Expression	108

6.4.6	Schritt 3: Integration einer TBX2-regulierten Expression von p21-d2EGFP	112
6.4.6.1	Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels Luciferase-Reportergenassay	113
6.4.6.2	Die TBX2-regulierte p21-d2EGFP-Expression im FACS	114
6.4.6.3	Test der Transfektionseffizienz durch Vergleich der Fluoreszenzsignalintensitäten von d2EGFP und maxGFP	116
6.4.6.4	Überprüfung der p21-regulierten d2EGFP-Expression an der Cellomics Arrayscan VTI Plattform	117
6.4.6.5	Transfektionseffizienz: Der Einfluss der Cotransfektion auf die Reportergenexpression	120
6.4.6.6	Untersuchung der p21-Expression nach TBX2-Induktion	121
6.4.6.7	Herstellung einer dreifach stabilen Tet-On-Zelllinie durch Transfektion der Zelllinie #A6.17 mit p21-d2EGFP	124
7	Diskussion	125
7.1	Mutantenanalyse	125
7.1.1	Die Rolle konservierter Aminosäuren für die DNA-Bindefähigkeit	125
7.1.2	Die DNA-Bindung der untersuchten potentiellen TBX3-Treibermutanten unter Betrachtung der Proteinstruktur	126
7.1.3	Repressionsstärke der potentiell treibermutanten TBX3-Proteine	128
7.1.4	Somatische <i>TBX3</i> -Mutationen bei Brustkrebstumoren	129
7.1.5	Der Einfluss der Mutation Y149S auf die TBX3-vermittelte p21-Repression	132
7.1.6	Regulation der TBX3-Aktivität durch posttranslationale Modifikationen: Die Rolle von SUMOylierung und Phosphorylierung für die p21-Repression	133
7.1.7	Die Rolle von Interaktionspartnern für die TBX3-vermittelte p21-Repression	134

7.2	Erzeugung einer Zelllinie als Screeningsystem zur Identifizierung TBX2-inhibierender Wirkstoffe	136
7.2.1	Transiente Transfektion zur qualitativen Überprüfung des Reporter-systems	136
7.2.2	Generierung einer dreifach stabilen Zelllinie	139
7.2.3	Alternative Strategien	141
8	Abkürzungsverzeichnis	145
9	Literaturverzeichnis	151
10	Anhang	175
10.1	Expression der rekombinanten GST-TBX3 1-342aa-Fusionsproteine im <i>E. coli</i> -Stamm BL21DE3	175
10.2	Repression des p21-FLuc-Reporters durch die TBX3-Mutation Y163fs2* .	177
10.3	In der ICGC-Datenbank gelistete <i>TBX</i> -Mutationen	178
10.4	Vergleich der somatischen Mutationsrate von <i>TBX3</i> mit der von anderen <i>TBX</i> -Genen	179
10.5	Positionen von Missense-Mutationen innerhalb des <i>TBX3</i> -Gens in unterschiedlichen Tumortypen	180
10.6	<i>TBX3</i> als signifikant mutiertes Gen in Brustkrebs	181
10.7	DNA-Alignment	181
10.7.1	TBX2dm vs. TBX2	181
10.7.2	TBX3dm vs. TBX3	182
10.7.3	Y163fs2* vs. TBX3	182
10.7.4	H187Y vs. TBX3	182
10.7.5	T210delT vs. TBX3	182
10.7.6	N212delN vs. TBX3	182
10.7.7	Y149S vs. TBX3	183
10.7.8	D275K vs. TBX3	183
10.7.9	LALA vs. TBX3	183
10.7.10	S674A vs. TBX3	183
10.7.11	GroBS vs. TBX3	183

10.7.12 CtBP1 vs. TBX3	184
10.7.13 CtBP2 vs. TBX3	184
10.7.14 CtBP3 vs. TBX3	184
10.8 Die p21-Promotorsequenz	184

1 Abstract

The closely related T-box transcription factors TBX2 and TBX3 are frequently overexpressed in various types of human cancer, in particular breast cancer and melanoma. The overexpression of TBX2 and TBX3 can have several cellular effects, among them suppression of senescence, promotion of epithelial-mesenchymal transition and invasive cell motility. In contrast, loss-of-function of *TBX3* and most other human T-box genes causes haploinsufficiency developmental defects. Stephens and colleagues^[1] identified five different mutations in *TBX3* by exome sequencing of breast tumor samples, all effecting the DNA-binding T-box domain. One in-frame deletion of a single amino acid, N212delN, was observed twice. Due to the clustering of the mutations to the T-box domain, *TBX3* was inferred to be a driver gene in breast cancer. Since mutations in the T-box domain generally cause loss-of-function and because the tumorigenic action of TBX3 has generally been attributed to overexpression, the putative driver mutations were analyzed whether they had loss- or gain-of-function properties. Two in-frame deletions, one missense and one frameshift mutant protein were tested for DNA binding *in vitro* and for target gene repression in cell culture. In addition, an *in silico* analysis of somatic *TBX* mutations in breast cancer collected in The Cancer Genome Atlas (TCGA) was performed. Both, the experimental and the *in silico* analysis indicate that the observed mutations predominantly cause loss-of TBX3 function.

For understanding the mechanism of TBX3-dependent gene repression, additional TBX3 mutants were analyzed for their repression of p21-promotor activity (p21-Luc reporter and endogenous *p21*-expression). Wild-typic p21-Luc repression was observed for two mutations that interfere with posttranslational modification D275K (SUMOylation) and S674A (phosphorylation) as well as for the M302A/V304A mutant that prevents interaction with the Rb1 tumor suppressor. Surprisingly, the repression of the endogenous *p21*-activity by these mutant proteins was stronger than wild-type TBX3. All three mutations enhanced

TBX3 protein stability. The binding deficient mutant Y149S was first detected in patients with ulnar-mammary syndrome. The mutant failed in repressing both, p21-Luc and endogenous *p21*. Mutations in potential interaction domains for binding of the corepressors Groucho and C-terminal binding protein showed wild-typic repression of p21-Luc as well as of endogenous *p21*. Apparently, these corepressors are not involved in *p21*-repression in COS-7 cells.

As TBX2 and TBX3 are potential targets for anti-cancer treatment, I tried to generate a cellular reporter system for identifying pharmacologically active substances that can inhibit TBX2. For this purpose, a constitutive p21-d2EGFP reporter and doxycycline-inducible TBX2 were used as ectopic TBX2 expression causes genomic instability and toxicity. In such a cell line, expression of TBX2 should result in a reduction of d2EGFP fluorescence. For generation of this cell line the following three constructs were integrated step-by-step into the genome of the cell line COS-7: pEF1 α -Tet3G, pTRE3G-TBX2 and p21-d2EGFP. While generation of the double stable COS-7 cell line succeeded, generation of the triple stable cell line failed.

2 Zusammenfassung

Die nahe verwandten T-box Transkriptionsfaktoren TBX2 und TBX3 werden in zahlreichen humanen Krebsarten überexprimiert, insbesondere in Brustkrebs und Melanomen. Die Überexpression von TBX2 und TBX3 hat verschiedene zelluläre Effekte, darunter die Unterdrückung der Seneszenz, die Förderung der Epithelialen-Mesenchymalen Transition sowie invasive Zellmotilität. Im Gegensatz dazu führt ein Funktionsverlust von *TBX3* und der meisten anderen humanen T-box-Gene zu haploinsuffizienten Entwicklungsdefekten. Durch Sequenzierung des Exoms von Brustkrebsproben identifizierten Stephens *et al.*^[1] fünf verschiedene Mutationen in *TBX3*, welche allesamt die DNA-bindende T-box-Domäne betrafen. Die In-Frame-Deletion N212delN wurde zweimal gefunden. Aus der Anhäufung der Mutationen innerhalb der T-box-Domäne wurde geschlossen, dass *TBX3* bei Brustkrebs ein Treibergen ist. Da Mutationen innerhalb der T-box-Domäne im Allgemeinen zu einem Funktionsverlust führen, aber die onkogene Aktivität von TBX3 meist auf eine Überexpression zurückzuführen ist, wurden die potentiellen Treibermutationen hinsichtlich einer verminderten oder gesteigerten TBX3-Funktion geprüft. Getestet wurden zwei In-Frame Deletionen, eine Missense- sowie eine Frameshift-Mutante bezüglich der DNA-Bindung *in vitro* und der Zielgen-Repression in Zellkultur. Zusätzlich wurde eine *in silico* Analyse der im The Cancer Genome Atlas (TCGA) gelisteten somatischen *TBX*-Brustkrebsmutationen durchgeführt. Sowohl die experimentelle als auch die *in silico* Analyse zeigten, dass die untersuchten Mutationen vorwiegend zum Verlust der TBX3-Funktion führen.

Um den Mechanismus der Genrepression durch TBX3 besser zu verstehen, wurden weitere TBX3-Mutanten bezüglich ihrer Wirkung auf die p21-Promotoraktivität (p21-Luc-Reporter und endogene *p21*-Expression) analysiert. Wildtypische p21-Luc-Repression zeigten die zwei Mutationen S674A (Phosphorylierung) und D275K (SUMOylierung), welche posttranslationale Modifikationen verhindern, sowie die Interaktion mit dem Tumorsuppressor Rb1 unterbindende M302A/V304A-Mutation. Erstaunlicherweise war die endogene *p21*-

Repression dieser Mutanten stärker als die des wildtypischen TBX3-Proteins. Alle drei Mutationen führten zu einer Stabilisierung des TBX3-Proteins. Die ursprünglich in Patienten mit Ulna-Mamma Syndrom identifizierte, DNA-bindungsdefekte Y149S-Mutante konnte weder p21-Luc noch endogenes *p21* reprimieren. Mutationen in potentiellen Interaktionsdomänen für die Bindung der Co-Repressoren Groucho und C-terminalem Bindeprotein zeigten sowohl auf p21-Luc als auch auf endogenes *p21*-Gen wildtypische Repressoraktivität, so dass diese Co-Repressoren in COS-7-Zellen wahrscheinlich nicht an der Repression dieses Gens beteiligt sind.

Da TBX2 und TBX3 interessante Ziele zur direkten Krebsbekämpfung darstellen, sollte ein zelluläres Reportersystem zur Identifikation TBX2-inhibierender, pharmakologisch aktiver Substanzen etabliert werden. Dazu sollte eine stabile Zelllinie mit vom p21-Promotor reguliertem d2EGFP-Reporter und Doxyzyklin-induzierbarem TBX2-Protein erzeugt werden, da ektopische Expression von TBX2 genetische Instabilität und Toxizität induzieren kann. In dieser Zelllinie sollte die TBX2-Expression zur Reduktion der d2EGFP-Fluoreszenz führen. Zur Erzeugung der Zelllinie wurden die folgenden drei Konstrukte Schritt-für-Schritt stabil in das Genom der Zielzelllinie COS-7 integriert: pEF1 α -Tet3G, pTRE3G-TBX2 und p21-d2EGFP. Während die Herstellung der doppelt stabilen COS-7-Zelllinie gelang, scheiterte die Herstellung der dreifach stabilen Zelllinie.

3 Einleitung

3.1 Die T-box-Genfamilie

Die T-box-Genfamilie kodiert für Transkriptionsfaktoren (TFs) mit einer charakteristischen 180-200 Aminosäuren umfassenden DNA-Bindedomäne, genannt T-box (TBX). Genexpression wird durch die Bindung der T-box an spezifische T-box-Bindeelemente (TBE) reguliert, wobei alle bekannten TBX-Proteine als Monomere die Kernsequenz GGTGTGA erkennen und binden können.^[2] Darüber hinaus können einige TBX-Proteine auch an davon abweichende Sequenzen binden.^[3-5] Die funktionelle Spezifität der TBX-TFs wird wesentlich durch den zellulären Kontext beeinflusst.^[6-8] Somit können TBX-TFs in Abhängigkeit von Co-Faktoren sowie des Promotorkontexts trotz der Bindung an ähnliche DNA-Bindemotive unterschiedliche Zielgene regulieren. Einige TBX-TFs können die Genexpression in Abhängigkeit des zellulären Kontextes sowohl aktivieren als auch reprimieren.^[9,10]

Die T-box wurde erstmalig im murinen *Brachyury* (*T*)-Gen identifiziert.^[11] 1992 entdeckten Pflugfelder *et al.*^[12] eine Sequenzhomologie im DNA-Bindemotiv zwischen dem *Drosophila*-Protein Optomotor-blind (Omb) und dem murinen T-Protein. Dieses wurde nach der Entdeckung desselben DNA-Bindemotivs in weiteren murinen Genen durch Bollag *et al.*^[13] als T-box bezeichnet. Brachyury kann als Monomer und als Dimer an die palindromische DNA-Sequenz [TTT(G/C)ACACCTAGGTGTGAA] binden.^[14] Bis heute wurden insgesamt 19 *TBX*-Gene identifiziert, die von *Drosophila* bis zum Menschen hoch konserviert sind.^[15] Phylogenetische Analysen deuten auf einen gemeinsamen Ursprung der T-box-Genfamilie zu Beginn der Metazoen-Evolution hin und untergliedern diese in fünf Unterfamilien, T, Tbx1, Tbx2, Tbx6 und Tbr1 (siehe Abb. 3.1).^[16,17]

Die Expression der *TBX*-Gene spielt eine wichtige Rolle bei zahlreichen Prozessen der embryonalen Entwicklung und der Organogenese.^[15,19-21] Die Relevanz dieser embryonalen

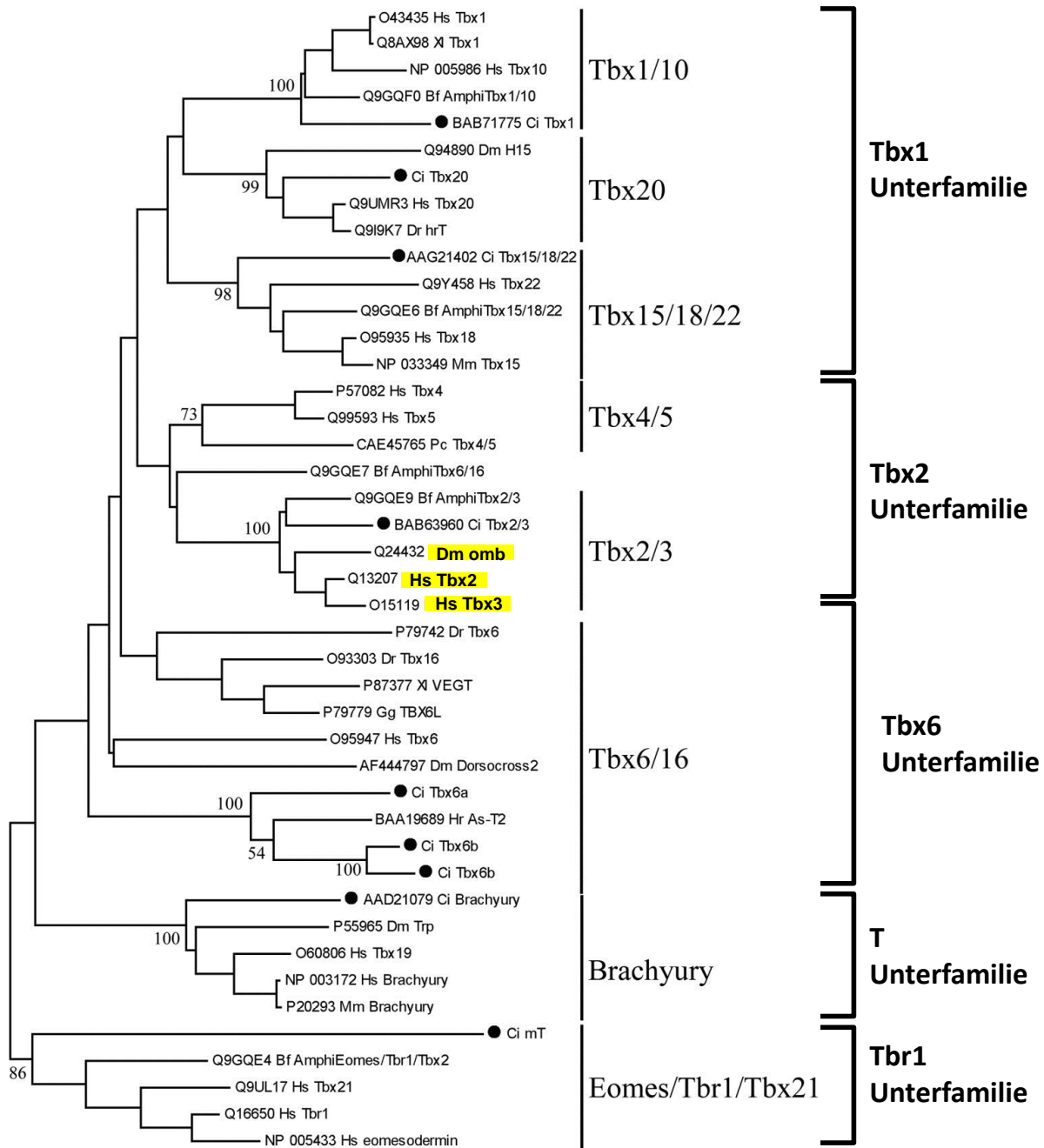


Abbildung 3.1: Phylogenetischer Stammbaum der T-box-Familie. Modifiziert nach Takatori *et al.*^[18] Hs, Homo sapiens; Gg, Gallus gallus; XI, Xenopus laevis; Dr, Danio rerio; Bf, Branchiostoma floridae; Ci, Ciona intestinalis; Dm, Drosophila melanogaster; Hr, Halocynthia roretzi; und Pc, Podocoryne carnea.

Expression wird dadurch belegt, dass eine funktionale Inaktivierung, z.B. infolge von Mutationen, zu dramatischen Entwicklungsdefekten von Geweben führen kann, in denen die *TBX*-Gene normalerweise exprimiert werden.^[15] Im Menschen wird eine Reihe von autosomal-dominanten (z.B. *TBX3*) und semi-dominanten (z.B. *TBX22*) genetischen Syndromen auf Haploinsuffizienz der *TBX*-Gene zurückgeführt.^[22] Bekannte Syndrome

sind das DiGeorge-Syndrom (TBX1), das Cousin-Syndrom (TBX15), die „isolated ACTH deficiency“ (TBX19), die „congenital heart disease“ (TBX20), sowie die „X-linked cleft palate und ankyloglossia“ (TBX22). Von Mutationen der Tbx2-Unterfamilie wie dem Ulna-Mamma-Syndrom (UMS, TBX3)^[23,24], dem „small patella syndrome“ (TBX4)^[25] und dem Holt-Oram-Syndrom (TBX5)^[26] sind häufig die Extremitäten betroffen.

3.2 Die Tbx2-Unterfamilie

Zur Tbx2-Unterfamilie gehören die paralogen Gene *TBX2*, *TBX3*, *TBX4* und *TBX5*. Im Menschen sind die Gene für *TBX2* und *TBX4* auf Chromosom 17q23 lokalisiert und die Gene für *TBX3* und *TBX5* auf Chromosom 12q24.^[16] Die Tbx2-Unterfamilie entstand durch Tandem-Duplikation und Cluster-Dispersion, so dass trotz der räumlichen Distanz die Gene *TBX2* und *TBX3* homolog zueinander sind, ebenso wie die Gene *TBX4* und *TBX5*. *TBX2* und *TBX3* sind orthologe Gene des *Drosophila*-Gens *omb*, welches ebenso zur Tbx2-Unterfamilie gehört (siehe Abb. 3.2).

TBX2 (siehe Abb. 3.2) spielt eine große Rolle bei der Entwicklung der vorderen und hinteren Gliedmaße, der Brustdrüsen, der Lunge, des Herzens, der Augen und der Nieren.^[15] Bisher konnte *TBX2* nicht direkt mit einer humanen Erbkrankheit in Verbindung gebracht werden. Aktuelle Studien assoziieren ein noch unbenanntes klinisches Syndrom, welches sich durch Mikrocephalie, einer postnatalen Wachstumsverzögerung, Abnormalitäten von Hand, Fuß und Extremitäten sowie Herzdefekten charakterisiert, mit *TBX2* und *TBX4* betreffenden Mikrodeletionen auf Chromosom 17q23.^[28,29] Die konservierte T-box-Domäne ist bei dem aus 712 Aminosäuren bestehenden *TBX2*-Protein zwischen den Aminosäuren 106 - 289 lokalisiert. Müller und Hermann^[7] zeigten einen Kontakt von Arginin 122 (R122) mit der großen Furche der DNA. Mutation von R122 führt zum Verlust der DNA-Bindung *in vitro*.^[30]

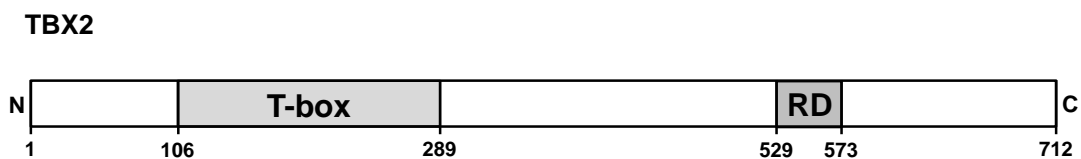


Abbildung 3.2: Das TBX2-Protein. Gezeigt ist Proteinsequenz von TBX2 entsprechend Wansleben *et al.*^[27]. Die T-box-Domäne umfasst die Aminosäuren 106-289. Die dominante Repressor-domäne (RD) umfasst die Aminosäuren 529-573. N, N-Terminus. C, C-Terminus.

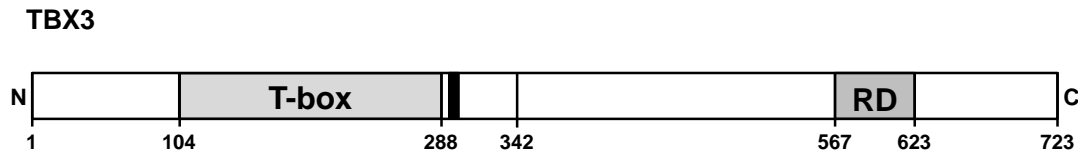


Abbildung 3.3: Das TBX3-Protein. Gezeigt ist Sequenz des 723 Aminosäuren umfassenden TBX3-Proteins. Die T-box-Domäne umfasst nach der Definition von Porsch *et al.*^[31] die Aminosäuren 104-288. Dahinter befindet sich das Kernlokalisierungssignal (schwarzer Balken). Die Repressordomäne (RD) enthält nach Carlson *et al.*^[32] die Aminosäuren 529-573. N, N-Terminus. C, C-Terminus.

Das *TBX3*-Gen codiert für ein aus 723 Aminosäuren bestehendes Protein (siehe Abb 3.3) mit einer T-box-Domäne zwischen den Aminosäuren 104-288.^[31] TBX3 (GenBank NM005996) spielt eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung wichtiger Organe wie z.B. Herz, Gliedmaßen, Genitalien und Brustdrüsen.^[24,32,33] Heterozygote Mutationen von *TBX3* führen zu UMS^[23,24], einem seltenen autosomal-dominanten klinischen Syndrom. Charakteristisch für UMS sind pleiotrope Defekte in der Entwicklung der Gliedmaßen, der apokrinen Drüsen, der Zähne, der Haare und der Geschlechtsorgane. Da bei UMS nicht alle *TBX3*-exprimierenden Gewebe betroffen sind, ist anscheinend die Dosis an funktionellem TBX3-Protein entscheidend. TBX3 wird in einer weiteren Isoform exprimiert, TBX3+2a (GenBank NM016569). Die Sequenz von TBX3+2a ist durch alternatives Spleißen um das 60 Basenpaar lange Exon 2a verlängert, was zu einer Verlängerung der T-box-Domäne um 20 Aminosäuren (AS 220-240) führt.^[24]

Obwohl beide auch über Aktivator-domänen verfügen, regulieren TBX2 und TBX3 im Gegensatz zu den beiden anderen Mitgliedern der Tbx2-Unterfamilie, TBX4 und TBX5, die Genexpression vornehmlich über Repression. Dies erfolgt über die dominante C-Terminale Repressordomäne (RD), welche bei TBX2 zwischen den Aminosäuren 529-573^[10] und bei TBX3 zwischen den Aminosäuren 567-623 lokalisiert ist.^[32] Trotz der überlappenden Expressionsdomänen während der Entwicklung verschiedener Organe kann die Expression von TBX2 und TBX3 gewebespezifisch und auf zellulärem Level in Zeit und Raum divergieren.^[34] Die über 90 %-ige Übereinstimmung der T-box-Domäne sowie die hohe Sequenzhomologie beider Proteine bezüglich der restlichen Proteinsequenz lässt darauf schließen, dass TBX2 und TBX3 ähnliche Zielgene regulieren können.^[5,33,35-37] Somit können redundante Funktionen nicht ausgeschlossen werden. So wäre es möglich, dass bei überlappender Expression sowohl TBX2 und TBX3 verminderte Proteinkonzentrationen des jeweils anderen Proteins je nach zellulärem Kontext ausgleichen können.^[24]

3.3 Kanzerogenese

Die Kanzerogenese beschreibt den Prozess der Entstehung von Krebserkrankungen, welche in der westlichen Welt die zweithäufigste Todesursache nach der International Agency for Research on Cancer (IARC) sind. Krebs ist ein Sammelbegriff für entartete Zellen, die durch ihr unkontrolliertes Wachstum Tumore bilden. Hierbei werden benigne (gutartig) und maligne (bösartig) Tumore unterschieden. Letztere zerstören durch invasives Wachstum das umliegende Gewebe. Bei einer Metastasierung bilden maligne Tumorzellen nach Ausbreitung über die Blut- oder Lymphbahn an den verschiedensten Körperregionen Tochterneoplasmen, sog. Metastasen, aus.^[38] Das Risiko einer Krebserkrankung wird durch kanzerogene Faktoren in der Umwelt, wie z.B. ionisierende Strahlen, kanzerogene Chemikalien, und Viren (z.B. HPV) erhöht.^[39–41] Auch eine ungesunde Lebensweise mit erhöhtem Alkohol- und Tabakkonsum, sowie Übergewicht begünstigt eine Krebserkrankung.^[39] In seltenen Fällen treten erblich bedingte Krebserkrankungen auf. Ein Beispiel hierfür sind Keimbahnmutationen der beiden Tumorsuppressorgene *BRCA1* (engl.: breast cancer susceptibility-Gen 1) und *BRCA2*, welche mit familiärem Brustkrebs sowie einem erhöhten Risiko zur Erkrankung an Eierstockkrebs assoziiert sind.^[42] Auslöser einer Krebsentstehung sind irreparable Veränderungen des zellulären Genoms durch Sequenzmutationen, Änderungen der Chromosomenzahl (Aneuploidie), sowie Chromosomentranslokationen.^[43,44] Auch epigenetische Veränderungen begünstigen die Tumorgenese, wie z.B. die Modulation der Transkription durch Veränderungen des Methylierungsmusters der DNA sowie Chromatinveränderungen durch Histonmodifikationen.^[44]

Die Entstehung von Krebs ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess mit langsamer Progression und hohem Zufallselement. Ein Hauptcharakteristikum für immortalisierte Zellen ist die genetische Instabilität.^[44] Diese beginnt bereits in der frühen Phase der Tumorentwicklung und verstärkt die Tumorprogression mit steigender Mutationsrate.^[45] Über die Zeit nimmt die Malignität durch den Erwerb zunehmender tumorspezifischer Eigenschaften, wie Unabhängigkeit von zellulären Wachstumssignalen, Resistenz gegen wachstumshemmende Signale, eingeschränkte Fähigkeit zum kontrollierten Zelltod (Apoptose), unbegrenztes replikatives Potential, Fähigkeit zur Angiogenese und die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung zu.^[46]

3.4 Die Rolle von Treibermutationen für die Kanzerogenese

Über die Zeit entwickeln sich Tumore durch Erhöhung der Mutationsrate in einem stufenweisen Prozess von benign zu malign, wobei die auftretenden Mutationen dem Zufall unterliegen. Charakteristisch enthalten Tumorzellen zahlreiche Genmutationen^[47], von denen die Substitution einzelner Basen (z.B. C > G) mit 95 % am häufigsten auftritt^[48]. Mutationen, welche die relative Fitness der betroffenen Zelle im Vergleich zu der Nachbarzelle erhöhen, werden positiv selektiert. Diese werden als Treibermutationen (engl.: driver gene mutation) bezeichnet, da sie zu einem Wachstumsvorteil einer Zelle führen und somit die Tumorprogression vorantreiben.^[48] Ein typischer Tumor enthält sechs bis acht dieser Treibermutationen.^[48] Gene, die eine Treibermutation enthalten, werden als Treibergene bezeichnet. Treibergene werden zellulären Signalwegen zugeordnet, welche an der Regulation von zellulären Kernprozessen wie die Determinierung des Zellschicksals, das Überleben der Zelle und die Erhaltung des Genoms beteiligt sind. Hierzu zählen Mutationen, die zu einer Aktivierung wachstumsfördernder Protoonkogene bzw. zu einer Hemmung von wachstumshemmender Tumorsuppressorgenen führen.^[49] So ist z.B. die Inaktivierung des Zellzyklus regulierenden Tumorsuppressorgens p53 ein wichtiges Ereignis in der Transformation von vielen Tumoren und das p53-Gen das am häufigsten mutierte Gen bei menschlichen Krebserkrankungen.^[50] Mutationen, die der Tumorzelle weder einen direkten noch einen indirekten Wachstumsvorteil bringen, werden als Passagiermutationen (engl.: passenger mutation) bezeichnet. Die Unterscheidung zwischen Treiber- und Passagiermutationen ist nicht trivial und Treibergene können sowohl Treiber- als auch Passagiermutationen enthalten.^[48]

3.5 TBX2/TBX3 und Krebs

Neben ihrer Schlüsselfunktion während der embryonalen Entwicklung und der Organogenese, erfüllen TBX2 und TBX3 auch eine wichtige Rolle bei der Kanzerogenese und der Tumorprogression. So werden TBX2 und TBX3 in zahlreichen Krebsarten überexprimiert, darunter Melanome, Tumore der Brust, Leber, Lunge, Pankreas, Ovarien, Blase und Cervix.^[27,51] Das *TBX2*-Gen ist auf 17q23 lokalisiert, einer chromosomalen Region,

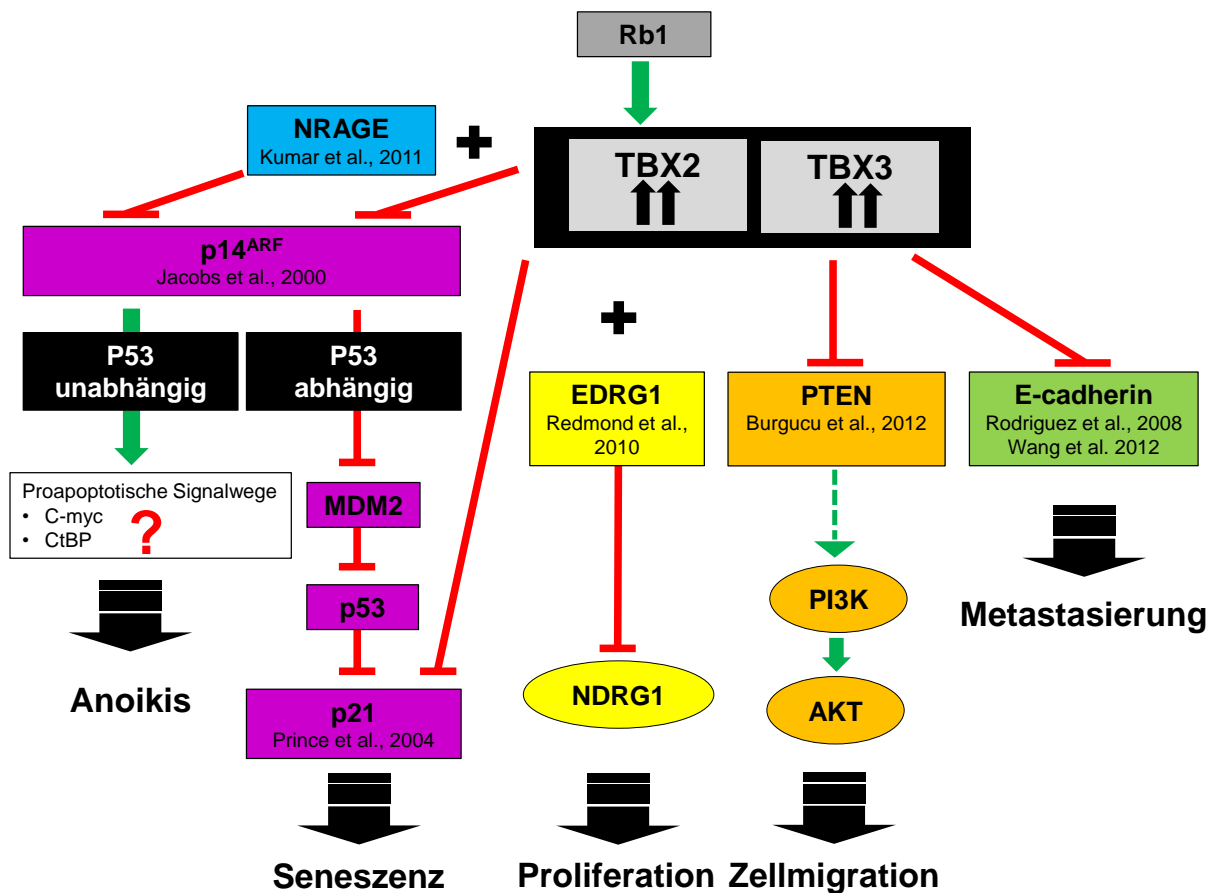


Abbildung 3.4: Potentielle Rolle von TBX2/TBX3 bei der Kanzerogenese und Tumorprogression. TBX2 und TBX3 fördern die Kanzerogenese und die Tumorprogression durch ihr Eingreifen in wichtige zelluläre Kontrollmechanismen zur Verhinderung der onkogenetischen Transformation. TBX2 inhibiert die p53-abhängige Seneszenz (irreversibler Zellzyklusarrest) durch Inhibition von ARF und p21CIP. Abb. verändert und erweitert nach Lu *et al.*^[51]

dessen Amplifikation mit zahlreichen Krebsarten assoziiert wird, wie z.B. Brustkrebs^[52], Melanome^[53], Ovarial-^[54] und Pankreaskarzinome^[55]. Gene innerhalb dieser Region werden mit der Tumorprogression in Verbindung gebracht. TBX2 wird häufig in invasiven Brusttumoren mit Mutation der beiden Tumorsuppressoren *BRCA1* und *BRCA2* überexprimiert.^[56] TBX2 ist als prognostischer Marker für kolorektale Karzinome im Gespräch, da eine TBX2-Überexpression in kolorektalem Tumorgewebe mit dem Tumorstadium, der Tumorinvasion, der Metastasierung und einer schlechten Prognose einhergeht.^[57] Die ektopische Expression von TBX2 in humanen transformierten Lungenfibroblasten-Zelllinien resultierte in Polyploidie und einer Resistenz gegen das Chemotherapeutikum Cisplatin.^[58] Normale Zellen schützen sich mit protektiven Kontrollmechanismen erfolgreich vor der onkogenetischen Transformation. So werden infolge von onkogenetischem Stress und DNA-Schädigungen zelluläre Signalwege aktiviert, welche die Apoptose oder die zelluläre

Seneszenz (irreversibler Zellzyklusarrest) einleiten. Infolge der Tumorprogression und der Immortalisierung werden diese Mechanismen nach und nach außer Kraft gesetzt. Der am besten charakterisierte Kontrollmechanismus zur Induktion der zellulären Seneszenz ist der vom Tumorsuppressorgen p53-abhängige ARF/MDM2/p53/p21-Signalweg.^[59,60] In normalen Zellen inaktiviert die Bindung von aktiviertem ARF (engl.: alternative reading frame) die Ubiquitin-Ligase MDM2 (engl.: murine double minute 2) und verhindert dadurch den MDM2-getriggerten proteasomalen Abbau von p53. Dies führt zu einer Anreicherung sowie einer Funktionsstabilisierung von p53, welches nun als TF die Expression des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors p21 (engl.: cyclin-dependent kinase inhibitor 1a, Cdkn1a) aktiviert. Die Aktivierung von p21 ist der Schlüsselprozess der p53-vermittelten Seneszenz, wobei p21 für die negative Regulation der Genexpression durch p53 benötigt wird.^[61] Zwei Studien zeigten die Seneszenz-inhibierende Funktion von TBX2^[35] und TBX3^[37], durch die direkte Repression von ARF (murin: p19ARF, human: p14ARF) auf transkriptioneller Ebene. Der ARF-codierende *CDKN2A*-Genlocus ist in zahlreichen Krebsarten mutiert, darunter vor allem Melanome.^[62,63] Da der Verlust des *CDKN2A*-Genlocus die Seneszenz-unterdrückenden Funktion von TBX2 und TBX3 abschwächt, war es wichtig, dass Prince *et al.* zeigen konnten, dass TBX2 die Seneszenz auch durch Repression der p21-Expression über eine direkte Bindung an den Promotor *in vivo* und *in vitro* verhindern kann.^[36] Somit können TBX2 und TBX3 an zwei unterschiedlichen Punkten direkt den ARF/MDM2/p53/p21-Signalweg beeinflussen (siehe Abb 3.4) und dadurch die Immortalisierung von Zellen durch Unterdrückung der Seneszenz fördern.^[35-37] Die TBX2 vermittelte Repression kann zusätzlich durch Interaktion mit dem hypophosphorylierten Zellzyklus-Regulator Retinoblastoma Protein (Rb1) verstärkt werden.^[64] p14ARF sensibilisiert Zellen in einem p53-unabhängigen Signalweg gegenüber Anoikis, einer speziellen Form der Apoptose. Die Anoikis wird in normalen Zellen nach einer Ablösung aus ihrem Zellverband zur Verhinderung der Metastasierung eingeleitet.^[65] Der Metastasierung geht der onkogene Prozess der Epithelialen-Mesenchymalen Transition (EMT) voran. Hierbei erlangen epitheliale Zellen einen mesenchymalen Phänotyp, welcher ein erhöhtes migratorisches Potential, Invasivität und Apoptoseresistenz beinhaltet.^[66,67] Daher spielt die EMT eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression.^[66,67] Ein Markenzeichen der schrittweisen Progression der EMT ist der Expressions- sowie der Funktionsverlust des für die Zell-Zell-Adhäsion epithelialer Zellen notwendigen E-Cadherin.^[66,67] Die Interaktion

von NRAGE (engl.: neutrophin receptor-interacting melanoma antigen) mit Ankyrin-G, einer Komponente des E-Cadherin-Komplexes, führt dazu, dass NRAGE im Zytoplasma verbleibt. Die onkogenetische EMT fördert den Abbau von Ankyrin-G, was dazu führt, dass NRAGE nun im Kern lokalisiert wird. Kumar *et al.* [68] konnten zeigen, dass TBX2 mit nukleärem NRAGE interagiert, was zu einer Repression von p14ARF und somit zu einer Desensibilisierung der betroffenen Zelle gegenüber Anoikis führt. Diese Studie impliziert NRAGE als einen Co-Repressor von TBX2/TBX3.

Redmond *et al.* zeigten, dass TBX2 in zahlreichen Brustkrebszelllinien wie z.B. MCF7 überexprimiert wird und ein Verlust von TBX2 in einem Wachstumsstopp resultiert, der mit der Einleitung von Seneszenz und Apoptose einherging. TBX2 fördert die Proliferation von Brusttumoren durch Repression des Wachstumsregulators NDRG1 (engl.: N-myc downregulated gene 1) nach Rekrutierung von EGR1 (engl.: early growth response 1). [69] Wang *et al.* [70] konnten nach Verlust von TBX2 zeigen, dass TBX2 in malignen Brustkrebszelllinien ein starker zellautonomer Induktor der EMT ist und einen aggressiven malignen mesenchymalen Tumorphänotyp induziert. Mittels CHIP und Reporterassays wurde in dieser Studie nachgewiesen, dass TBX2 direkt die Expression des Tumorsuppressorgens E-Cadherin reprimiert, dessen Verlust häufig ein wichtiger Schritt der malignen Tumorphänotyp darstellt. [66,67] Auch in Melanomzellen ist E-Cadherin ein klassisches Ziel von TBX2. [71,72] Durch Herunterregulation der endogenen TBX3-Expression in verschiedenen Melanom-Zelllinien konnten Rodriguez *et al.* [71] die Invasivität der Zellen verringern und nachweisen, dass TBX3 die metastatische Aktivität von Krebszellen durch Herunterregulation der E-Cadherin-Expression fördert. Analog dazu führte ein siRNA-Knock-Down von TBX3 in der Melanomzelllinie ME1402 zu einer erhöhten Konzentration an E-Cadherin-Transkript. [72] Auch *in vivo* war eine erhöhte TBX3-Proteinkonzentration ausreichend um die Tumorbildung und Invasivität von nicht-karzinogenen Melanomzellen voranzutreiben, vermutlich durch die TBX3-vermittelte E-Cadherin-Repression. [73]

Zudem ist TBX3 in HNSCC (engl.: head and neck squamous cell carcinoma) ein direkter Repressor des Tumorsuppressors PTEN (engl.: Phosphatase und Tensin Homolog). [74] PTEN ist ein negativer Regulator des Zellzyklus-regulierenden PI3K-Signalwegs (engl.: Phosphatidylinositid-3-Kinase). Da dieser Signalweg eine wichtige Rolle in der Tumorphänotyp spielt [75], könnte die TBX3-vermittelte PTEN-Repression über eine Erhöhung des PI3K-Levels das Umgehen der Seneszenz erleichtern, sowie die Zellmigration und somit

die Invasivität fördern.

In aktuellen Mutagenese-Studien von Brustkrebs-Exomen wurden verschiedene somatische Mutationen in *TBX3* identifiziert. Bei der Analyse von 350 Brustkrebstumoren identifizierten Stephens *et al.* drei In-frame-Deletionen, bei denen trotz der Deletion einer Aminosäure das Leseraster erhalten bleibt. Hierbei wurde N212 in zwei Tumoren gefunden. Zusätzlich wurden drei Frameshift-Mutationen mit ab Mutationsort verschobenem Leseraster identifiziert. Alle Sequenzmutationen häuften sich in einer 50 Aminosäuren umfassenden Region der T-box-Domäne von *TBX3*. Aufgrund der nicht-zufälligen Mutationensanhäufung und auch basierend auf der hohen relativen Mutationsfrequenz wurde *TBX3* als Treiber gen charakterisiert.^[1] In einer weiteren Studie analysierten Kandoth *et al.* die Exome von 12 Tumortypen (The Cancer Genome Atlas, TCGA). Unter Gebrauch des MuSIC tool^[76] identifizierten sie *TBX3* als signifikant mutiertes Gen (SMG) mit einer erhöhten Mutationsrate relativ zum Hintergrund, speziell in Brustkrebs-Tumoren, darunter ebenfalls die Mutation N212.^[77]

3.6 Posttranslationale Modifikation von Proteinen

In eukaryotischen Zellen wird die Funktionalität der exprimierten Proteine hauptsächlich über posttranslationale Modifikationen (PTM) gesteuert.^[78,79] PTMs umfassen alle kovalenten Modifizierungen von Proteinen nach ihrer Proteinbiosynthese und erhöhen die Diversität des Proteoms. Aktuell werden über 450 PTMs in der Uniprot Datenbank gelistet.^[79] Die biologische Aktivität von Proteinen kann zu jedem Zeitpunkt über PTMs moduliert werden, wobei die Reversibilität von der Art der jeweiligen Modifikation abhängig ist. Häufig erfolgen die Modifikationen durch die enzymatische Verknüpfung von funktionellen Gruppen an bestimmte Aminosäuren, wie z.B. bei der Phosphorylierung, der Acetylierung, der Formylierung, der Glykosylierung und der Methylierung.^[78,79] Bei der Ubiquitinierung sowie der SUMOylierung ist der Mechanismus wesentlich komplexer. Hier werden die Polypeptide Ubiquitin bzw. SUMO über eine Enzymkaskade mit ihren Substratproteinen verknüpft.^[80]

3.6.1 Phosphorylierung

Die Phosphorylierung ist die häufigste reversible PTM und reguliert nahezu alle grundlegenden zellulären Prozesse, darunter den Metabolismus, das Wachstum, die Zellteilung, die Differenzierung, DNA-Reparaturmechanismen, die Apoptose, den membrangebundenen Transport, Protein-Protein-Interaktionen, Enzymreaktionen, den Abbau zahlreicher Proteine, sowie die Modulation intrazellulärer Signalkaskaden.^[78,81,82] Bei der Phosphorylierung katalysieren Proteinkinasen (PKs) den Transfer des γ -Phosphats von ATP an spezifische Aminosäurereste, wobei in Eukaryoten hauptsächlich Aminosäurereste von Serin, Threonin und Tyrosin phosphoryliert werden.^[82] Die biologische Signifikanz der Phosphorylierung zeigt sich darin, dass PKs eine der größten humanen Genfamilien darstellen. Insgesamt wurden 518 für PKs codierende Gene (das sog. Kinom) identifiziert, was ca. 2 % des humanen Genoms entspricht.^[83] Darüber hinaus werden schätzungsweise über 30 % aller zellulären Proteine an mindestens einem Aminosäurerest phosphoryliert.^[81] Das Entfernen der Phosphatgruppe, die Dephosphorylierung, wird durch zahlreiche Phosphatasen (PPs) katalysiert.^[78,81] Die Dynamik zwischen Phospho- und Dephosphorylierung funktioniert wie ein molekularer Schalter, über den z.B. Komponenten von Signaltransduktionskaskaden aktiviert oder inaktiviert werden können. Dies ermöglicht der Zelle eine schnelle und unkomplizierte Reaktion auf extrazelluläre Signale. Phosphorylierungskaskaden sind sensitiv und äußerst effektiv, da sie auf eine große Vielfalt an Regulatoren reagieren können. Zudem ermöglichen sie die Interaktionen zwischen den Signalwegen (engl.: cross-talk) und haben zugleich einen Verstärkungseffekt.^[79] Ein gut untersuchtes Beispiel einer Phosphorylierungskaskade ist der u.a. mit dem Zellwachstum assoziierte MAPK-Signalweg (engl.: mitogen-activated protein kinase).^[84] Dieser besteht aus einer Kaskade an MAPKs, welche ihre Substratproteine an spezifischen Serin- oder Threonin-Resten phosphorylieren. Die MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKKs) aktivieren durch Phosphorylierung die MAPK-Kinasen (MAPKKs) und diese wiederum die MAPKs. Die aktivierten MAPKs können in der Zelle weitere Substratproteine phosphorylieren, was häufig die Kerntranslokation genregulatorischer Proteine induziert. Zudem stellt die Phosphorylierung zahlreicher Substratproteine durch spezifische Kinasen, den sog. Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks), eine Qualitätskontrolle an spezifischen Kontrollpunkten im eukaryotischen Zellzyklus dar. Die Aktivität der Cdks ist abhängig von Cyclinen, welche von den Cdks als regulatorische

Untereinheiten gebunden werden.^[85,86] Dadurch kann die Aktivität der Cdks über die Verfügbarkeit der Cykline reguliert werden. Während Cdks in annähernd gleichbleibender Konzentration vorliegen, oszilliert die Cyklin-Konzentration im Verlauf der einzelnen Zellzyklusphasen.^[87] Die zeitliche Spezifität der CDK-Cyklin-Komplexe wird dadurch gewährleistet, dass Cykline durch Ubiquitylierung einem raschen zellulären Abbau unterliegen, wodurch die CDK-Cyklin-Komplexe nur zu einem bestimmten Zeitpunkt innerhalb des Zellzyklus aktiv sind.^[88]

Die zelluläre Konzentration sowie das richtige Zusammenspiel zwischen PKs und PPs spielt eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homeostase. Eine deregulierte Phosphorylierung spielt häufig auch bei der Transformation einer Zelle zu einer Krebszelle eine wichtige Rolle. Zahlreiche Kinase-codierende Gene sind Protoonkogene und viele Onko- und Tumorsuppressorproteine sind Phosphoproteine. So wird z.B. die Funktion des Rb1-Tumorsuppressorproteins über eine zellzyklusabhängige Phosphorylierung gesteuert.^[89] Eine deregulierte Phosphorylierung führt u.a. zur Entstehung von Retinoblastomen (Tumoren der Retina), da Rb seine Funktion als Wachstumsbegrenzer nicht mehr erfüllen kann.^[90]

3.6.2 SUMOylierung

Die SUMO-Familie codiert für das Ubiquitin-ähnliche Protein SUMO (engl.: small ubiquitin-like modifier) und besteht in Säugern aus den vier Isoformen SUMO1 bis SUMO4.^[91] Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Ubiquitin erfolgt die kovalente Verknüpfung von SUMO an Substratproteine, die SUMOylierung, über einen verwandten enzymkatalysierten Prozess über das aktivierende E1-Enzym, das konjugierende E2-Enzym und das ligierende E3-Enzym (siehe Abb. 3.5).^[91]

Wie bei allen Ubiquitin und Ubiquitin-ähnlichen Proteinen üblich, muss die zur Aktivierung benötigte reife Form von SUMO mit der Hilfe von Proteasen zunächst aus einem Vorläuferprotein gewonnen werden. Nach der Prozessierung enthält das reife SUMO-Protein ein C-terminales Diglycin-Motiv (GG). Dieses wird zur Aktivierung durch das heterodimere SUMO aktivierende E1-Enzym (SAE, SUMO-aktivierendes Enzym) benötigt, welches sich aus den beiden Untereinheiten SAE1 und SAE2 zusammensetzt. Während des Aktivierungsprozesses wird SUMO am C-terminalen Glycinrest durch SAE1 unter

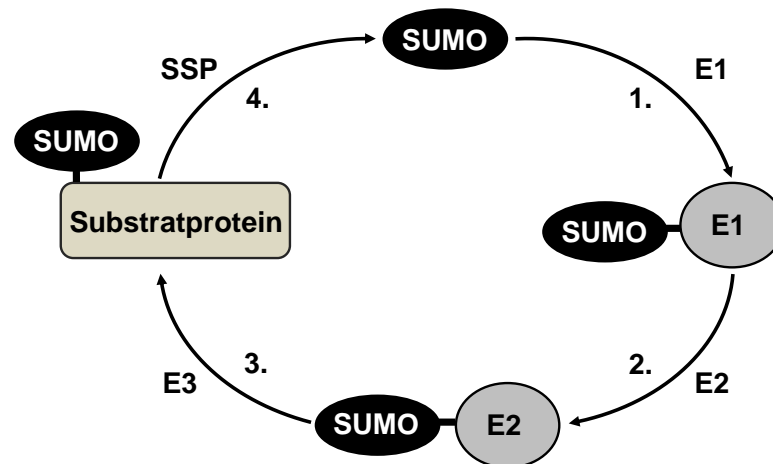


Abbildung 3.5: Prozess der SUMOylierung. Die SUMOylierung ist eine kovalente enzymkatalysierte posttranslationale Modifizierung von Proteinen. Die SUMOylierung beinhaltet die Aktivierung von SUMO durch das Enzym E1 (1.), die Konjugation mit dem Enzym E2 (2.) sowie die Ligation an das Substratprotein durch das Enzym E3 (3.). Die SUMOylierung ist ein dynamischer Prozess und durch SUMO-spezifische Proteasen (SSP) reversibel (4.). Abb. Verändert nach Shuai und Liu.^[92]

ATP-Verbrauch adenyliert und das SUMOadenylat über eine Thioesterbindung mit einem konservierten Cystein in SAE2 verknüpft. Bei der Konjugation wird SUMO von E1 unter erneuter Verknüpfung einer Thioesterbindung auf ein konserviertes Cystein im katalytischen Zentrum des konjugierenden Enzyms SUMO E2 (UBC9, engl.: ubiquitin conjugating enzyme 9) übertragen. Im letzten Schritt katalysiert die SUMO E3-Ligase den Transfer von SUMO auf die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrests im Zielprotein.^[91,92] Unter normalen Bedingungen unterliegt SUMO4 einem schnellen zellulären Abbau, da ein Prolin anstelle eines Glutamin an Position 90 dessen Reifung und Konjugation verhindert.^[93] Erst auf Grund von zellulärem Stress wie z.B. Nährstoffmangel erfolgt die Reifung durch die stress-induzierte Hydrolase und die anschließende Konjugation von SUMO4 an seine Substratproteine.^[94]

Die SUMOylierung ist ein hoch dynamischer Prozess, dessen Reversibilität durch SUMO-spezifische Proteasen (SSP) bewerkstelligt wird.^[91,92] Während die Ubiquitynylierung die Substratproteine für einen schnellen proteasomalen Abbau markiert, reguliert die SUMOylierung essentielle zelluläre Prozesse wie die Transkription, die Replikation, die Chromosomensegregation und auch DNA-Reparaturmechanismen sowie auch die Lokalisation, die Aktivität, und die Stabilität von Proteinen oder auch Interaktionen mit anderen Proteinen.^[91,92]

Die SUMOylierung in der Zelle ist bisher noch wenig verstanden und erfolgt bevorzugt am konservierten Aminosäuremotiv Ψ KXE/D (Ψ steht für die Aminosäuren L, I, V oder F, und X für jede beliebige Aminosäure).^[95] Zudem können SUMO-Proteine zelluläre Prozesse steuern, indem sie über diese speziellen SUMO-Interaktions-Motive (SIM) mit zellulären Proteinen eine nicht-kovalente Bindung eingehen können.^[96] Die Identifikation von SIMs in potentiellen SUMO-Substraten ist die Grundlage um den molekularen Regulationsmechanismus sowie die Funktion der SUMOylierung besser verstehen zu können. Dies ist von großer Bedeutung, da eine deregulierte Balance zwischen SUMOylierung und DeSUMOylierung nicht nur mit der onkogenetischen Transformation von Krebszellen in Verbindung gebracht wird, sondern auch mit neurodegenerativen Erkrankungen und Entwicklungsdefekten sowie Diabetes.^[91,97]

3.7 Co-Repressoren

Die Bindung von TFs an DNA-Sequenzen von Promotor- und Enhancerregionen erfolgt häufig erst nach der Rekrutierung von modulierenden Co-Regulatoren. Viele dieser Co-Regulatoren besitzen eine intrinsische Enzymaktivität und beeinflussen die Genexpression durch Modifizierung der Chromatinstruktur. So enthalten viele Co-Repressorkomplexe Histon-Deacetylasen (HDAC), welche Acetylgruppen von Lysinresten am Amino-Ende der Kernhistone entfernen. Dadurch wird durch Erhöhung der positiven Ladung die DNA-Bindeaffinität der Histone gesteigert.^[98] Zu den bekanntesten für Co-Repressoren codierenden Genfamilien gehören die Groucho/TLE-Genfamilie und Genfamilie der C-terminalen Bindeproteine (CtBP).

3.7.1 Die Groucho (Gro)/TLE-Genfamilie

Die hoch konservierte Groucho (Gro)/TLE-Genfamilie codiert für transkriptionale Co-Repressoren.^[99,100] Diese spielen sowohl während der embryonalen Entwicklung, z.B. bei der Regulation von Zelldifferenzierungs- und Musterbildungsprozessen, eine wichtige Rolle, als auch in adultem Gewebe. Gro-Proteine sind nukleäre Faktoren, die in zahlreichen Geweben eines Organismus exprimiert werden. Sowohl bei Invertebraten als auch bei Vertebraten sind die Mitglieder der Gro/TLE-Genfamilie an der Regulation wichtiger

Signalwege beteiligt, darunter Notch, Wingless/Wnt und Dpp/BMP/TGF- β .^[100]

Das *gro*-Gen ist Teil des E(spl)-C (engl.: enhancer of split complex)^[99], einer kompakten, für dreizehn Transkripte codierenden chromosomalen Region. *E(spl)*-Gene codieren für Komponenten des Notch-Signalwegs, wo sie über den Mechanismus der lateralen Inhibition die Differenzierung in epidermale und neurale Vorläuferzellen initiieren.^[101–103] Aufgrund der Sequenzähnlichkeit zur β -Untereinheit von heterotrimeren G Proteinen wie Transducin sowie seiner Rolle im Notch-Signalweg wurde davon ausgegangen, dass Gro ein zytoplasmatisches, signalübermittelndes Molekül ist. Daher wurden die vier 1992 identifizierten homologen Vertebratengene TLE1 (engl.: transducin-like Enhancer of split 1) bis TLE4 genannt.^[104] Der Nachweis der Interaktion von Gro mit dem DNA-bindenden TFs Hairy im Hefe-Zwei-Hybrid-System war der erste Anhaltspunkt dafür, dass Gro eine transkriptionsregulierende Rolle erfüllt.^[105]

Aufgrund des fehlenden intrinsischen DNA-Bindemotivs erfordert die Gro-vermittelte Repression die Rekrutierung von DNA-Bindeproteinen an spezifische genregulatorische Sequenzen. Die Interaktion erfolgt über ein kurzes Proteinmotiv. Dieses kann in zwei Klassen untergliedert werden: WRPW und verwandte Tetrapeptide sowie das eh1-Motiv FxIxxIL, wobei x für eine beliebige Aminosäure steht.^[100] Dennoch ist die Gro-vermittelte Repression weitgehend unverstanden und vermutlich auf Einzelfallebene abhängig vom biologischen Kontext und den rekrutierten TFs. Die Gro/TLE-vermittelte Repression, z.B. von Hairy, erfolgt über eine weite genomische Distanz.^[106] Hierbei spielen möglicherweise zwei Prozesse eine wichtige Rolle, welche zudem auch miteinander koordiniert werden könnten: die Inhibierung des RNA Polymerase II-Komplex und Chromatinumstrukturierungen.^[107] So wurde auch eine Interaktion der GP-Domäne von *Drosophila*-Gro mit der Histon Deacetylase Rpd3 (human: HDAC1) nachgewiesen.^[108] Gro bindet an alle vier Kernhistone mit Präferenz zu H3.^[109] Somit reprimieren Gro/TLE-Faktoren die Genexpression über Induktion einer inaktivierenden Chromatinstruktur. In Korrelation mit der Beteiligung an wichtigen zellulären Signalwegen ist die Expression humaner TLE-Proteine in einigen Tumoren signifikant verändert.^[99]

3.7.2 Die Genfamilie der C-terminalen Binde Proteine (CtBP)

Die hoch konservierte Genfamilie der C-terminalen Binde Proteine (CtBP) codiert in höheren Eukaryoten für transkriptionale Co-Repressoren.^[98,110] CtBPs spielen eine wichtige Rolle bei zahlreichen Prozessen während der embryonalen Entwicklung. Das Genom von Invertebraten enthält ein *CtBP*-Gen, das von Vertebraten enthält zwei *CtBP*-Gene (*CtBP1* und *CtBP2*), welche auf zwei unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind.^[111] Entdeckt wurden CtBPs in den frühen 90ern als C-terminaler Interaktionspartner des adenoviralen Proteins E1A.^[112,113] CtBPs rekrutieren ihre Interaktionspartner als Dimere und erkennen ein spezifisches Pro-X-Asp-Leu-Ser (PXDLS) Motiv, welches erstmalig in E1A entdeckt wurde.^[113] Zu den Interaktionspartnern zählen zahlreiche Transkriptionsrepressoren mit sequenzspezifischen DNA-Binde-Motiv und deren Co-Faktoren^[98,110], darunter HDAC. Zusätzlich erfolgt die Interaktion einiger TFs über das sekundäre redundante RRT-Motiv.^[110] Da in einigen Fällen die HDAC-Inhibitoren keinen Einfluss auf die CtBP-vermittelte Repression ausübten und der Versuch CtBP-assoziierte Deacetylase-Aktivität nachzuweisen scheiterte, kann die Repression durch CtBPs auch unabhängig von HDACs erfolgen.^[98] Aufgrund der signifikanten Homologie mit D-Isomer-spezifischen 2-Hydroxysäure Dehydrogenasen (D2-HDH)^[113] ist auch eine direkte Repression der Genexpression über eine intrinsische enzymatische Aktivität von CtBPs möglich. Aus *Drosophila*-Studien geht hervor, dass CtBP vorwiegend mit sog. Kurz-Distanz-Repressoren, wie z.B. Snail, Knirps und Krüppel interagiert.^[114] Diese inhibieren die Genexpression über Interaktion mit Enhancer-/Promotorregionen über eine kurze Distanz von < 100- 200 Basenpaaren zum Transkriptionsstartpunkt. Dies unterscheidet CtBPs von den Gro-Co-Repressoren, deren Repression eher über eine weite Distanz zum Transkriptionsstartpunkt erfolgt.^[106] Zudem werden CtBPs mit der Tumorgenese und der Tumorprogression als auch mit chemoresistenten Tumoren in Verbindung gebracht.^[115-117] CtBPs fördern durch die Repression der Expression von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. E-Cadherin, die EMT^[115], was die Metastasierung und somit die Malignität von Tumorzellen begünstigt. Aus Studien mit E1A geht hervor, dass CtBPs als Apoptose-Antagonisten funktionieren^[118] und durch den Verlust der Interaktion zwischen E1A und CtBP wurden Tumorzelllinien weniger sensitiv gegenüber Anoikis^[119].

3.8 Traditionelle chinesische Medizin (TCM) zur gezielten Bekämpfung von Krebs

Ein Schlüsselproblem der konventionellen Tumorbekämpfung mit Chemotherapeutika ist die Entwicklung einer Resistenz gegenüber den verwendeten Arzneimitteln sowie schwerwiegende Nebeneffekte.^[120] Daher ist die Identifikation von Therapeutika mit schonenderer Wirkung erforderlich. Hierbei bietet das systematische Screenen bioaktiver Produkte eine Alternative zu synthetischen, chemischen Substanzbanken.^[121,122] In der Tat sind mehr als die Hälfte der international zwischen 1940 und 2006 zugelassenen Mittel zur Krebsbehandlung entweder natürliche Produkte, deren Derivate oder wurden auf Basis von natürlich vorkommenden Substanzen entwickelt.^[123] Nur 25.000 von geschätzt 250.000 bis 300.000 Pflanzenspezies wurden bisher auf ihren medizinischen Nutzen getestet.^[124] In der traditionellen Medizin ist die Position der über 5.000 Jahre anhaltenden Tradition der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) aufgrund der hohen Varietät an pflanzlichen Substanzen und der guten Dokumentation einzigartig. Die Gesamtheit der TCM beinhaltet den Gebrauch medizinischer Produkte pflanzlichen, tierischen oder mineralischen Ursprungs sowie Akupunktur und andere Heilmethoden.^[121] Während die traditionelle Medizin auf die Behandlung des gesamten Körpers abzielt, ist die westliche Wissenschaft auf die Bekämpfung von Krankheiten mittels Medikamenten auf zellulärem oder molekularem Level fokussiert.^[121] Durch die Kombination des aus beiden Methoden erworbenen Wissens können neue, verbesserte Strategien zur gezielten Bekämpfung von Krebs geschaffen werden.^[121] Ein Großteil der potentiell für den medizinischen Gebrauch verwendbaren Pflanzenprodukte sind sekundäre Metabolite, welche in ihrer natürlichen Funktion die Pflanze vor zahlreichen Pathogenen sowie Herbivoren schützt und auch als Wachstumsregulatoren wirken.^[125] Aufgrund der pharmakologischen Eigenschaften von vielen sekundären Pflanzenmetaboliten besteht die Möglichkeit, dass diese sich auch zur Bekämpfung von Krebs eignen. In der Tumorthherapie ist die DNA ein klassisches Ziel für TCM-basierte Arzneistoffe. Einige Substanzen, wie z.B. alkylierende Agenzien, können die DNA-Struktur direkt beeinflussen, andere Substanzen haben einen indirekten Einfluss auf die DNA-Struktur, z.B. durch Inhibierung von DNA-metabolisierenden Enzymen. Ebenso sind an der Regulation essentieller zellulärer Funktionen z.B. Zellteilung beteiligte

Proteine interessante Ziele für TCM-basierte Arzneistoffe.^[121] Somit ist die Identifikation von Pflanzenextrakten mit wachstumsinhibierendem Effekt von großer Bedeutung für die Weiterentwicklung der heutigen Tumorthherapie.

3.9 Reporteragenassays

Reporteragenassays dienen der funktionellen Analyse der Genexpression. Zudem kann die Aktivität der für die Genexpression notwendigen TFs und Co-Regulatoren bezüglich einer regulatorischen Sequenz (Promotor, Enhancer oder Silencer) quantifiziert werden. So können mittels Reporteragenassay wichtige Mechanismen von zellulären Signalwegen auf ihre Funktionalität näher charakterisiert werden.^[126,127] Die Durchführung eines Reporteragenassays soll schnell, einfach und zuverlässig sein, sowie eine hohe Spezifität und Sensitivität gewährleisten, so dass kleine und große Veränderungen der Reporteragenexpression direkt detektiert werden können.^[126] Diese wird über einen natürlichen oder synthetischen Promotor mit zahlreichen Bindestellen für TFs oberhalb eines Minimalpromotorelements reguliert.^[126,127] Durch Bestimmung der relativen Reporteragenexpression können Rückschlüsse auf die Funktionsweise und Aktivität der genregulatorischen Sequenzen und Faktoren gezogen werden. Die Effektivität und Sensitivität eines Reporteragens ist abhängig von zahlreichen Faktoren, darunter das Genexpressionslevel einer Zelle sowie der Stabilität des exprimierten Reporterproteins im inter- und intrazellulären Milieu.^[128] Um ein klar definiertes Signal zu erhalten, dürfen Reporterogene weder von den Wirtszellen endogen exprimiert werden noch deren Physiologie beeinträchtigen. Reporterogene codieren leicht detektierbare Proteine, darunter Enzyme, detektierbare Antigene, Fusionsproteine oder fluoreszierende Proteine. Häufig verwendete Reporter sind die vom *lacZ*-Gen codierte β -Galaktosidase (β -Gal), die vom *cat*-Gen codierte Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT), die vom *phoA*-Gen codierte Alkalische Phosphatase, biolumineszente Enzyme wie Luciferasen und fluoreszierende Proteine wie das Grün Fluoreszierende Protein (GFP).^[126,127] Die Wahl des Reporteragens ist abhängig von der verwendeten Zelllinie, der Sensitivität, der dynamischen Reichweite sowie der Einfachheit und der Verlässlichkeit des Assays sowie der gewählten Messmethode.^[126,127] Fluoreszenzbasierte Reporterassays werden meist zum mikroskopischen *in vivo* Nachweis in Zellen genutzt^[127] und erlauben eine wiederholbare Messung. Unter bestimmten Versuchsbedingungen kann eine starke unspezifische Auto-

oder Hintergrundfluoreszenz der Zellen die Detektionsschwelle von fluoreszenten Reportern negativ beeinträchtigen.^[127] Die Lumineszenzreaktionen der Luciferasen sind bei minimalem Hintergrund hoch sensitiv^[129], benötigen aber ein Substrat.

3.10 Grün Fluoreszierendes Protein (GFP)

Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) ist das am häufigsten verwendete Reportergen. Der Erfolg des 238 Aminosäuren umfassenden GFP-Proteins (26,7 kDa) begann nach der Klonierung der GFP-Sequenz der aus der Qualle *A. victoria* im Jahre 1992^[130] und hält bis heute an. GFP-Proteine werden in zahlreichen pro- und eukaryotischen Systemen als Reportergene verwendet, da sie hervorragend für Studien zur Genexpression und Proteinlokalisierung *in vivo*, *in situ* und in Echtzeit (engl.: real time) geeignet sind.^[127,131] Nach Absorption von blauem und ultraviolettem (UV) Licht mit zwei Absorptionsmaxima ($\lambda_{\max} = 395$ und 470 nm) emittiert GFP grünes Licht ($\lambda_{\max} = 509$ nm)^[131,132], welches direkt und nicht-invasiv in der lebenden Zelle quantifiziert werden kann^[127,131]. Das für die Lichtabsorption benötigte Chromophor besteht aus einem zyklischen Tripeptid der Aminosäuren 65-67 (Serin (S65) - Tyrosin (Y66) - Glycin (G67)). Die GFP-Autofluoreszenz ist unabhängig von Substraten oder Co-Faktoren, setzt aber die akkurate Faltung des Proteins voraus.^[127,131,132]

Die Eigenschaften von GFP wurden, z.B. zur verbesserten Expression in Säugerzellen, stetig weiterentwickelt. Codonoptimierte GFP-Varianten, wie z.B. EGFP (engl.: enhanced GFP), sind deutlich stabiler und die Verschiebung des zweigipfligen Anregungsmaximums zu einem einzigen Maximum führt zu einer verstärkten Fluoreszenzintensität.^[127,131] Neben dem grünen EGFP wurden auch eine gelbe (EYFP, engl.: yellow) und eine cyanfarbene (ECFP) Variante entwickelt.^[131]

Zusätzlich wurden destabilisierte EGFP-Varianten (dEGFP, dECFP und dEYFP) durch Fusion mit den Aminosäureresten 422-462 der C-terminalen Region der Maus Ornithin Decarboxylase (MODC) generiert. Durch die darin codierte PEST-Sequenz (P - Prolin, E - Glutamin, S - Serin, T - Threonin) wird das Fusionsprotein für einen schnellen intrazellulären Abbau markiert. Während die Halbwertszeit der stabilen Proteine > 24 h beträgt, existieren destabilisierte Varianten mit Halbwertszeiten von ein (d1), zwei (d2) oder vier (d4) Stunden. Die Fluoreszenzintensität sowie die spektralen Eigenschaften der

destabilisierten Varianten sind identisch denen der Originalchromophore. Aufgrund der geringeren Halbwertszeit können die destabilisierten Varianten zur präzisen Messung von Kinetiken oder der Promotoraktivität verwendet werden.

3.11 Identifizierung pharmakologisch aktiver Substanzen im Hochdurchsatzscreening (HDS)

Mittels Reporterassay kann die biologische Relevanz von pharmakologisch aktiven Substanzen bezüglich eines spezifischen Zielproteins überprüft werden.^[126,127] In einem typischen Hochdurchsatzscreening (HDS) werden Substanzbanken bestehend aus 50.000 bis 500.000 Substanzen im industriellen Maßstab getestet. Ein sog. Treffer (engl.: hit) definiert sich als eine Aktivierung oder Inhibierung des Signals über einen genau definierten, über dem Hintergrundsignal liegenden Schwellenwert, ausgelöst durch die getestete Substanz.^[133,134] Die Qualität des Assays wird durch das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (engl.: signal-to-noise-ratio) wesentlich beeinflusst. Allgemeine Kriterien an einen HDS-Assay sind ein kleines Reaktionsvolumen sowie ein hoher Durchsatz, Robustheit, Reproduzierbarkeit und Akkuranz.^[133,134] Da bei den meisten HDS-Programmen jede Substanz jeweils nur ein- oder zweimal getestet wird, ist eine hohe Sensitivität gegenüber den durch die pharmakologisch aktiven Substanzen ausgelösten Veränderungen ein kritischer Parameter bei der Evaluierung eines HDS-Assays. Ein HDS-Assay muss mit hoher Zuverlässigkeit die Substanzen mit signifikanter biologischer Aktivität erkennen.^[133,134] Daher eignen sich nicht alle routinemäßig in der Biochemie und Zellbiologie eingesetzten Reporterassays zur Durchführung im industriellen Maßstab. Durch die Weiterentwicklung der Fluoreszenzmikroskopie und der Möglichkeit der Erfassung des Fluoreszenzsignals auf Einzelzellebene im Mikroplattenformat, sind fluoreszente Proteine beliebte Reportergene im HDS-Screeningsystem. Die im primären Screening identifizierten „hits“ müssen anschließend in Folgestudien bezüglich ihrer Wirksamkeit, Spezifität, Toxizität, Struktur-Aktivität-Beziehung und *in vivo* bezüglich des pharmakologischen Potentials und dessen Effizienz näher charakterisiert werden.^[134]

3.12 Tet-On 3G-System zur induzierbaren Genexpression

Das in dieser Arbeit verwendete von Clontech betriebene Tet-On 3G™-System basiert auf der Grundlage des Anfang der 90er Jahre entwickelten Tetrazyklin (Tet)-induzierbaren Systems zur Regulation der Genexpression.^[135] Das System basiert auf zwei regulatorischen Komponenten, die beide ihren Ursprung im Tet-Resistenz-Operon von *E. coli* haben. Beide Komponenten können mit Hilfe von Plasmiden in eine Zelllinie eingeschleust und dort exprimiert werden. Im Tet-On 3G-System codiert der pEF1 α -Tet3G-Vektor für das konstitutiv exprimierte Transaktivatorprotein Tet-On 3G (siehe Abb. 3.6). Das zu aktivierende Zielgen steht im pTRE3G-Vektor unter der Kontrolle des induzierbaren TRE3G-Promotors, welcher 7 Wiederholungen der 19 bp langen Tet-Operatorsequenz (TetO) enthält. Die Induktion der Genexpression erfolgt im Tet-On 3G-System durch die

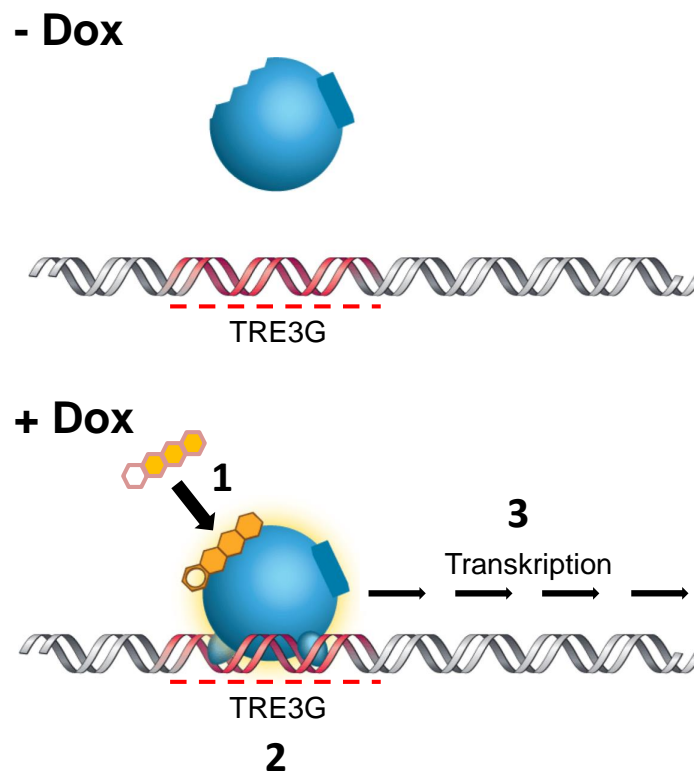


Abbildung 3.6: Das Tet-On 3G™-System zur induzierbaren Genexpression. Ohne Dox (-Dox) findet keine TRE3G-regulierte Genexpression statt. Die Zugabe von Dox (+Dox, orange, 1) induziert die konformationsabhängige Bindung von Tet-On 3G-Aktivatorprotein (blau) an den TRE3G-Promotor (2) und aktiviert dadurch die Transkription nachgeschalteter Gene (3). Modifizierte Abb. aus dem Clontech-Protokoll.

Zugabe des Tet-Derivats Doxyzyklin (Dox). Dieses wird anstelle von Tet zur Induktion verwendet, da das Tet-On 3G-System gegenüber der Aktivierung durch Dox ca. hundertmal sensitiver im Vergleich zu Tet ist.^[136,137] Nach Zugabe von Dox bindet Tet-On 3G infolge einer Konformationsänderung an die TetO im TRE3G-Promotor. Diese Bindung aktiviert die Expression nachgeschalteter Gene. Da ohne Antibiotikum keine Transkription des Gens stattfindet^[136], ermöglicht das Tet-On 3G-System eine präzise, reversible und dosisabhängige Aktivierung der Genexpression.

4 Zielsetzung

TBX2 und TBX3 werden neben ihrer Rolle für die normale Entwicklung von Brustgewebe sowohl in Brustkrebszelllinien als auch in Tumorgewebe überexprimiert.^[35,56,69,138–140] *TBX3* wurde in zwei Brustkrebs-Studien als signifikant mutiertes Gen (SMG)^[77] und Treibergen^[1] identifiziert. Da insbesondere die T-box betreffende Mutationen im Allgemeinen einen Funktionsverlust induzieren und die kanzerogene Funktion von TBX3 hauptsächlich mit einer Überexpression assoziiert wird, sollte im Rahmen dieser Arbeit die molekulare Funktionsweise von vier, der in den Studien von Stephens *et al.*^[1] sowie von Kandath *et al.*^[77] identifizierten, potentiellen TBX3-Treibermutationen bezüglich eines Funktionsverlusts oder einer Funktionssteigerung analysiert werden. Zu diesem Zweck sollten die In-Frame-Deletionen T210delT und N212delN, die Missense-Mutation H187Y sowie die Frameshift-Mutante Y163fs2* auf DNA-Bindung *in vitro* sowie bezüglich der Zielgenexpression in transienten Reporterassays getestet werden. Zusätzlich sollte eine *in silico* Analyse der im The Cancer Genome Atlas (TCGA) gesammelten somatischen *TBX3*-Mutationen durchgeführt werden.

Basierend auf der direkten Repression des p21-Promotors durch TBX3 sollten weitere TBX3-Funktions- und Interaktionsmutanten hinsichtlich ihrer p21-Aktivität (Reporterassay und qPCR) getestet werden, darunter die Rb1-Interaktionsmutante M302A/V304A und die dominant-negative Mutante Y149S. Ebenso zu testen waren die beiden Mutanten S674A (Phosphorylierung) und D275K (SUMOylierung), welche posttranslationale Modifikationen verhindern. Da die von Transkriptionsfaktoren vermittelte Gen-Repression häufig durch Interaktion mit Co-Repressoren wie Groucho (Gro) oder den C-terminalen Bindeproteinen (CtBP) vermittelt wird, sollten zusätzlich *in silico* identifizierte, potentielle Gro- bzw. CtBP-Interaktionsstellen innerhalb der *TBX3*-Sequenz mutiert und die Mutanten ebenso bezüglich ihrer p21-Aktivität analysiert werden.

Da TBX2 und TBX3 zudem interessante Ziele zur direkten Bekämpfung von Krebs sind,

sollte, basierend auf der p21-Repressorfunktion von TBX2, ein zelluläres Reportersystem zur Identifizierung von TBX2-inhibierenden pharmakologisch aktiven Substanzen etabliert werden. Hierzu sollte eine stabile Reporterzelllinie generiert werden, die TBX2 sowie das Reportergen d2EGFP unter der Kontrolle des p21-Promotors exprimiert. Da die ektopische Expression von TBX2 zur genomischen Instabilität führt^[58] und auf einige Zelllinien toxisch wirkt^[141], sollte die TBX2-Expression über das Tet-On 3G-System zur induzierbaren Genexpression reguliert werden. Zu diesem Zweck sollte TBX2 unter die Kontrolle des induzierbaren TRE3G-Promotors gebracht werden. Die Generierung der Zelllinie erforderte drei Transfektionsrunden, bei denen die Plasmide pEF1 α -Tet3G, pTRE3G-TBX2 und p21-d2EGFP stabil in das Genom der Zielzelllinie COS-7 integriert werden sollten. Die Inhibierung der p21-Repressoraktivität von TBX2 durch pharmakologisch aktive Substanzen sollte schließlich fluoreszenzmikroskopisch über die d2EGFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden.

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien, Stimulanzen und Kits

β -Mercaptoethanol (Carl Roth)	DIG Luminescent Detection Kit for
Acrylamid (30 %, AppliChem)	Nucleic Acids (Roche)
Acrylamid (40 %, AppliChem)	Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich)
Adenosintriphosphat (ATP, Sigma-Aldrich)	Dithiothreitol (DTT, Clontech)
Agar (AppliChem)	Doxyzyklin (Dox, AppliChem)
Agarose (AppliChem)	Dual-Luciferase [®] Reporter Assay System
Ameisensäure (AppliChem)	(Promega)
Ammoniumperoxodisulfat (APS, Sigma-Aldrich)	Dulbecco's Modified Eagle Medium
BioLux [®] <i>Gaussia</i> -Luciferase Assay Kit	(DMEM) ohne L-Glutamin, steril
(New England Biolabs)	(Biochrom AG)
Bio-Magermilchpulver (fettarm, Sucofin)	Endofree Plasmid Maxi Kit (QIAGEN)
Blocking Reagenz (Roche)	Essigsäure (AppliChem)
Borsäure (Carl Roth)	Ethanol (99,99 % und 70 % vergällt, Carl Roth)
Bovine Serum Albumin (BSA, Carl Roth)	Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich)
Bromphenolblau (Sigma-Aldrich)	Ethylenediaminetetraacetic acid
Carbenicillin (AppliChem)	(EDTA, AppliChem)
CHAPS (Carl Roth)	Fötale Kälberserum (FCS, engl.: Fetal Calf
Chloroform (Carl Roth)	Serum, Biochrom AG)
Coomassie Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich)	Gateway [®] LR Clonase [®] Enzyme Mix
Covalight [®] Chemiluminescent Reagent Kit	(Invitrogen)
(Covalab)	GenElute [™] Plasmid Midiprep Kit
Cycloheximid (CHX, Sigma-Aldrich)	(Sigma-Aldrich)

GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Adrich)	NP-40 (Sigma-Aldrich)
Genetizin (G418, Biochrom AG)	PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)
Glycerin (bzw. Glycerol, Carl Roth)	Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich)
Glycin (Carl, Roth)	PBS Dulbecco (w/o Ca ²⁺ , w/o Mg ²⁺), steril (Biochrom AG)
Harnstoff (Carl Roth)	Penizillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml) (flüssig, Biochrom AG)
HEPES (Sigma-Aldrich)	Phenol (Carl Roth)
Hi Speed Plasmid Maxi Kit (QIAGEN)	Phenylmethylylsulfonylfluorid (PMSF, SERVA)
High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)	Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) (Poly(dI-dC), Sigma-Aldrich)
Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich)	Ponceau S (Carl Roth)
Hygromycin B (HygB, Biochrom AG)	Proteinase Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich)
In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech)	Proteinase Inhibitor Tabletten (Roche)
Isoamylalkohol (bzw. Isopentanol, Carl Roth)	PureCube Gluthation Agarose (CubeBiotech)
Isopropanol (Carl Roth)	Puromycin (Puro, Santa cruz Biotechnology)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, Biotech Trade Service)	QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
Kaliumchlorid (KCL, AppliChem)	QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)
Kanamycin (AppliChem)	Quik Change II XL Site Directed Mutagenesis (Agilent Technologies)
KAPA SYBR FAST ABI Prism (peqlab)	RNeasy Mini Kit (QIAGEN)
LB-Medium (Luria/Miller, Carl Roth)	Roti-Quant (5x, Carl Roth)
L-Gluthathione, reduziert (CubeBiotech)	Salzsäure (rauchend 37 %, Carl Roth)
LongRange PCR Kit (QIAGEN)	SOB-Medium (New England Biolabs)
Luciferase Assay System (Promega)	Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, Carl Roth)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ , Carl Roth)	SuperScript® III First Strand Synthesis Kit (Invitrogen)
Maleinsäure (Sigma-Aldrich)	TEMED (Carl Roth)
MassRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific)	Thioharnstoff (AppliChem)
Methanol (Carl Roth)	
Na ₂ EDTA (AppliChem)	
Natriumacetat (AppliChem)	
Natriumchlorid (NaCl, Carl Roth)	
Natriumhydroxidplättchen (AppliChem)	

Transfektionsreagenz, FuGENE® HD (Promega)	Wasser, doppelt destilliert (ddH ₂ O, Carl Roth)
Trypsin/EDTA (Biochrom AG)	Wasser, nuklease-frei (Thermo Scientific)
Tween20 (AppliChem)	
Venor™ GeM Mycoplasma Detection Kit (Sigma Aldrich)	

5.2 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Annealing-Puffer: 10 mM Tris (pH 7,9), 50 mM KCl und 0,2 mM EDTA.

Coomassie-Entfärbelösung: 40 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure in dest. Wasser.

Coomassie-Färbelösung: 0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue, 40 % (v/v) Methanol und 10 % (v/v) Essigsäure in dest. Wasser.

EMSA-Elektrophoresepuffer: 1 % Glycerin in TBE-Laufpuffer.

EMSA-Puffer (2x): 20 mM HEPES, 100 mM KCl, 1 mM DTT, 0,25 mM EDTA, 0,01 % NP-40, 1 mM MgCl₂, 8 % Glycerol, 100 µg/ml BSA und 0,1 mg/ml Poly(dI-dC) in dest. Wasser.

Ethidiumbromid-Färbelösung: 8 - 10 Tropfen einer wässrige Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) in 500 ml dest. Wasser.

FACS-Fixans: 4 % (v/v) PFA in PBS.

FACS-Puffer: 0,5 % BSA, 5 mM EDTA und 0,01 % NaN₃ in PBS.

Harnstoff-Lysepuffer: 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 5 mM DTT und 2 % CHAPS in dest. Wasser.

Laemmli-Puffer: wurde als 6x Konzentrat angesetzt: 10 % SDS, 0,35 M Tris, 34,4 % Glycerin, 0,06 % Bromphenolblau und 10 % β-Mercaptoethanol in dest. Wasser.

LB-Agarplatten: 25 g LB-Medium und 15 g Agar in 1 l dest. Wasser und anschließend autoklavieren.

LB-Medium: 25 g LB-Medium in 1 l dest. Wasser lösen und danach autoklavieren.

PBS: 1,4 M NaCl und 0,1 M NaH₂PO₄ in dest. Wasser, pH 7,2.

Polyacrylamidgel (6 %): 6,75 ml 1x TBE, 5,47 ml dest. Wasser, 300 µl 100 % Glycerol, 2,25 ml 40 % Acrylamid (37,5:1), 225 µl 10 % APS und 15 µl TEMED.

Ponceau S-Färbelösung: wurde als 5x-Konzentrat angesetzt und vor Gebrauch 1:5 mit dest. Wasser verdünnt. 5x-Konzentrat: 2 % (w/v) Ponceau S und 30 % Trichloressigsäure in dest. Wasser.

Sammelgel (pH 6,8, 5 %): 3,4 ml dest. Wasser, 630 µl 1 M Tris (pH 6,8), 50 µl 10 % SDS, 830 µl 30 % Acrylamid, 50 µl 10 % APS und 5 µl TEMED.

SDS-Laufpuffer: wurde als 10x-Konzentrat angesetzt und 1:10 mit dest. Wasser verdünnt. 10x-Konzentrat: 30,2 g Tris, 144 g Glycin und 10 g SDS mit dest. Wasser auf 1 l auffüllen, pH 8,3.

Stripping-Puffer: 62,5 mM Tris, 2 % SDS und 0,4 % β-Mercaptoethanol in dest. Wasser, pH 6,8.

TBE-Laufpuffer: wurde als 10x-Konzentrat angesetzt und vor Versuchsbeginn 1:10 mit dest. Wasser verdünnt. 10x-TBE-Laufpuffer: 60,55 g Tris, 30,9 g Borsäure und 9,8 g Na₂EDTA auf 1 l dest. Wasser.

TBS: wurde als 10x-Konzentrat angesetzt und vor Gebrauch 1:10 mit dest. Wasser verdünnt. 10x-TBS: 40 g NaCl, 1,0 g KCl und 15 g Tris in 500 ml dest. Wasser, pH 7,5.

TBST: 100 ml TBS (10x) und 100 µl Tween 20 in 1 l dest. Wasser, pH 7,5.

Transferpuffer: 14,4 g Glycin und 3,03 g Tris in 1 l dest. Wasser.

Trenngel (pH 8,8, 10 %): 4,0 ml dest. Wasser, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 100 µl 10 % SDS, 3,3 ml 30 % Acrylamid, 100 µl 10 % APS und 10 µl TEMED.

Trenngel (pH 8,8, 8 %): 4,6 ml dest. Wasser, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 100 µl 10 % SDS, 2,7 ml 30 % Acrylamid, 100 µl 10 % APS und 10 µl TEMED.

5.3 Geräte

Abzug Typ 2-418NL und 2-426 NLS (Köttermann)
Analysewaage Kern-440-47 und Kern-440-33 (Hartenstein)
Axiovert Filterset Fluoreszenz (Carl Zeiss GmbH)
Cellomics ArrayScan VTI HCS Reader (Thermo Scientific)
Durchflusszytometer FACS Canto (BD Biosciences)
Eismaschine AF100 (Scotsman)
Elektrophorese-System Mini Protean Tetra-Cell SDS-PAGE (Bio-Rad)
Elektrophorese-System Sub-Cell GT für Agarosegelelektrophorese (Bio-Rad)
Feinwaage AM50 (Mettler-Toledo)
Fluoreszenzmikroskop Hochdurchsatz Cellomics Arrayscan[®] VTI HCS Reader
(Thermo Scientific)
Gel Dokumentationssystem Gel Jet Imager (Intas)
GloMax[®] 96 Microplate Luminometer (Promega)
HXP 120C Lichtquelle für die Fluoreszenzmikroskopie (Visitron Systems GmbH)
Inkubator ESCO CCL-170B-8 (Biomedis)
Inkubator mit integriertem Schüttler Innova 4230 (New Brunswick Scientific)
Klonierungsringe aus Edelstahl, 10 mm (Hartenstein)
Magnetrührer Hotplate Stirrer Model L-81 (Hartenstein)
Mikroplatten Spektrophotometer Power Wave XS (Biotek)
Mikroskop Axiovert 40 CFL (Zeiss)
Mikrowelle (Home Elektrik)
Multikanalpipetten Ergo One (0,5- 10 µl, 10- 100 µl, 100- 300 µl; Starlab)
Nanodrop 2000 Spektrophotometer (Thermo Scientific)
Netzgerät PS 500XT DC Power Supply (Hofer Scientific Instrument)
PCR-Gerät Mastercycler Gradient (Eppendorf AG)
pH-Meter InoLab pH-Level 1 (Hartenstein)
Photometer BioPhotometer (Eppendorf AG) und Spectra Fluor Plus (TECAN)
Pipetten 0,5- 10 µl, 10- 100µl und 100- 1000 µl (LABMATE) und 20- 200 µl und
100- 1000 µl (Gilson)
Pipettierhelfer Accu-jet[®] pro (Brand)
qPCR-Gerät StepOnePlus[™]Real-Time PCR-System (Applied Biosystems)
Röntgenfilmkassette (Dr.Goos Suprema)

Schüttler Mini Rocker, Mini Rocker MR-1 und Real IKA Vibrax VWR-basic (Hartenstein) und End-over-End (Heidolph)
Spektrophotometer Power Wave XS (BioTek)
Sterilbank BHA48 (Faster)
Thermo-Block TDB-120 (Hartenstein)
Thermo-Shaker Mixing-Block MB 102 (Hartenstein)
Thermo-Shaker TS1 (Hartenstein)
UV Stratalinker 2400 (Stratagene/Agilent Technologies)
UV-System zur Geldokumentation (Intas)
Vortexer Vortex Genie 2 (Scientific Industries) und L24 (Hartenstein)
Wasserbad SW22 (Julabo), F12 (Kältebad, Julabo) und W12 (Medingen)
Zählkammer Fuchs-Rosenthal (Hartenstein)
Zentrifuge Rotina 35 (Hettich), 4K15C (Sigma Aldrich), 5415D (Eppendorf AG), 5417R (Eppendorf AG), 5424 (Eppendorf AG) und 5702 (Eppendorf AG)

5.4 Verbrauchsmaterial

24, 12, 6 Well-Platten, steril (Greiner bio-one)
96 Well-Platten Flach- und Rundboden, steril (Greiner bio-one)
96 Well-Platten Flachboden, weiß, steril (Nunc by Thermo Scientific)
96 Well-Platten Mikro Amp Fast mit Barcode (Applied Biosystems)
96 Well-Platten, schwarz mit durchsichtigem Boden (Greiner bio-one)
Amersham HybondTM-PVDF Transfer Membrane (GE Healthcare)
Amersham HyperfilmTMECL Röntgenfilm (GE Healthcare)
CryosTM(Greiner bio-one)
FACS-Röhrchen 0,6 ml (Greiner bio-one)
Glaspipetten (Hartenstein)
Küvetten, RNase- und DNase-frei (Eppendorf AG)
Nitrilhandschuhe (Carl Roth)
Nylon Membrane, positively charged (Roche)
Parafilm (Sigma Aldrich)
Petrischalen, steril (Sarstedt)
Pipettenspitzen 0,1 - 10 µl, 10 - -200 µl und 100 - 1000 µl (Sarstedt)

Pipettenspitzen, steril, 0,1 - 10 µl und 10 - 200 µl (Starlab)

Pipettenspitzen, steril, 0,1 - 10 µl, 10 - 200 µl und 100 - 1000 µl) (Sarstedt)

Reaktionsgefäße, 0,2 ml (Thermo Scientific)

Reaktionsgefäße, 1,5 und 2 ml (Sarstedt)

Reaktionsgefäße, 1,5 ml (Eppendorf AG)

Reaktionsgefäße, 15 ml (Greiner bio-one)

Reaktionsgefäße, 15 ml (Sarstedt)

Reaktionsgefäße, 50 ml (Greiner bio-one)

Reaktionsgefäße, 50 ml (Sarstedt)

Serologische Plastikpipetten, steril, 2, 5, 10, 25 und 50 ml (Sarstedt)

Spritzen, steril, 5 und 10 ml (B.Braun Melsungen AG)

Sterilfilter, steril, 0,45 und 0,22 µm (Merck-Millipore)

T25 und T75 CELLSTAR® Filter Top Zellkultur Flaschen, steril (Greiner bio-one)

Whatman-Papier (Hartenstein)

5.5 Enzyme

5.5.1 Restriktionsenzyme

Name (Hersteller)

Benzonase® nuclease (Merck)

In-Fusion® HD Enzyme (Clontech)

KAPA SYBR Fast Hot-Start Polymerase (peqlab)

LongRange Polymerase (QIAGEN)

LR Clonase® (Invitrogen)

Lysozym (SERVA)

Pfu Ultra DNA Polymerase (Agilent Technologies)

Pfx Platinum Polymerase (Invitrogen)

Proteinase K (Invitrogen)

SuperScript® III (Invitrogen)

5.5.2 Sonstige Enzyme

Name (Hersteller)

BamHI (New England Biolabs)

BglII (New England Biolabs)

DpnI (Agilent Technologies)

HindIII (New England Biolabs)

KpnI (New England Biolabs)

Sall (New England Biolabs)

XhoI (New England Biolabs)

5.6 Antikörper

5.6.1 Primäre Antikörper

Antigen	Spezies	Typ	Klon	Verdünnung	Hersteller
FLAG	Maus	Monoklonal	M2	1:1000 - 1:2000	Sigma Aldrich
GFP	Maus	Monoklonal	7.1 und 13.1	1:1000	Roche
GST	Maus	Monoklonal	B14	1:500	Santa cruz Biotechnology
Tubulin	Maus	Monoklonal	B-5-1-2	1:1000	Sigma Aldrich

5.6.2 Sekundäre Antikörper

Antigen	Konjugat	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Maus	HRP	Ziege	1:10.000	Jackson ImmunoResearch Inc.

5.7 Bakterienstämme

BL21DE3: chemisch kompetente *E. coli* (New England Biolabs). Genotyp: *fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5*.

NEB 5-alpha: chemisch kompetente *E. coli* (New England Biolabs). Genotyp: *fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*.

NEB10 beta: chemisch kompetente *E. coli* (New England Biolabs). Genotyp: *Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14-φ 80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)*.

XL10-Gold: ultrakompetente *E. coli* (Agilent Technologies). Genotyp: *Tet^r delta-(mcrA) 183 delta-(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]*.

5.8 Vektoren

5.8.1 Entry-Vektoren

Konstrukt (Hersteller)

TBX2-3xFLAG/pENTR/D-TOPO (A. Legler^[142])

TBX2dm-3xFLAG/G121A/R122S/pENTR/D-TOPO (siehe Kap. 6.1)

TBX3-3xFLAG/pENTR/D-TOPO (A. Legler^[142])

TBX3dm-3xFLAG/G129A/R130S/pENTR/D-TOPO (siehe Kap. 6.1)

TBX3mut-3xFLAG/ GroBS/CtBP1-2-3/pENTR/D-TOPO (siehe Kap. 6.1)

TBX3mut-3xFLAG/CtBP1/pENTR/D-TOPO (siehe Kap. 6.1)

TBX3mut-3xFLAG/CtBP1-2-3/pENTR/D-TOPO (siehe Kap. 6.1)

TBX3mut-3xFLAG/CtBP2/pENTR/D-TOPO (siehe Kap. 6.1)

TBX3mut-3xFLAG/CtBP2-3/pENTR/D-TOPO (siehe Kap. 6.1)

TBX3mut-3xFLAG/CtBP3/pENTR/D-TOPO (siehe Kap. 6.1)

TBX3mut-3xFLAG/D275K/pENTR/D-TOPO (siehe Kap. 6.1)

TBX3mut-3xFLAG/GroBS/pENTR/D-TOPO (siehe Kap. 6.1)

TBX3mut-3xFLAG/H187Y/pENTR/D-TOPO (siehe Kap. 6.1)

TBX3mut-3xFLAG/LALA/pENTR/D-TOPO (siehe Kap. 6.1)

TBX3mut-3xFLAG/N212delN/pENTR/D-TOPO (siehe Kap. 6.1)

TBX3mut-3xFLAG/S674A/pENTR/D-TOPO (siehe Kap. 6.1)

TBX3mut-3xFLAG/T210delT/pENTR/D-TOPO (siehe Kap. 6.1)

TBX3mut-3xFLAG/Y149S/pENTR/D-TOPO (siehe Kap. 6.1)

TBX3mut-3xFLAG/Y163fs2*/pENTR/D-TOPO (siehe Kap. 6.1)

5.8.2 Destinations-Vektoren

Bezeichnung Konstrukt (Hersteller)

CtBP1 TBX3mut-3xFLAG/CtBP1/pT-REx-DEST30 (siehe Kap. 6.1)

CtBP1-2-3 TBX3mut-3xFLAG/CtBP1-2-3/pT-REx-DEST30 (siehe Kap. 6.1)

Bezeichnung	Konstrukt (Hersteller)
CtBP2	TBX3mut-3xFLAG/CtBP2/pT-REx-DEST30 (siehe Kap. 6.1)
CtBP2-3	TBX3mut-3xFLAG/CtBP2-3/pT-REx-DEST30 (siehe Kap. 6.1)
CtBP3	TBX3mut-3xFLAG/CtBP3/pT-REx-DEST30 (siehe Kap. 6.1)
D275K	TBX3mut-3xFLAG/D275K/pT-REx-DEST30 (siehe Kap. 6.1)
Destinationsvektor	pT-REx-DEST30 (Invitrogen)
GroBS	TBX3mut-3xFLAG/GroBS/pT-REx-DEST30 (siehe Kap. 6.1)
GroBS/CtBP1-2-3	TBX3mut-3xFLAG/ GroBS/CtBP1-2-3/pT-REx-DEST30 (siehe Kap. 6.1)
H187Y	TBX3mut-3xFLAG/H187Y/pT-REx-DEST30 (siehe Kap. 6.1)
Kontrolle (Kontr.)	pT-REx/GW-30/lacZ (Invitrogen)
LALA	TBX3mut-3xFLAG/LALA/pT-REx-DEST30 (siehe Kap. 6.1)
N212delN	TBX3mut-3xFLAG/N212delN/pT-REx-DEST30 (siehe Kap. 6.1)
S674A	TBX3mut-3xFLAG/S674A/pT-REx-DEST30 (siehe Kap. 6.1)
T210delT	TBX3mut-3xFLAG/T210delT/pT-REx-DEST30 (siehe Kap. 6.1)
TBX2	TBX2-3xFLAG/pT-REx-DEST30 (A. Legler ^[142])
TBX2dm	TBX2mut-3xFLAG/G121A/R122S/pT-REx-DEST30 (siehe Kap. 6.1)
TBX3	TBX3-3xFLAG/pT-REx-DEST30 (A. Legler ^[142])
TBX3dm	TBX3mut-3xFLAG/G129A/R130S/pT-REx-DEST30 (siehe Kap. 6.1)
Y149S	TBX3mut-3xFLAG/Y149S/pT-REx-DEST30 (siehe Kap. 6.1)
Y163fs2*	TBX3mut-3xFLAG/Y163fs2*/pT-REx-DEST30 (siehe Kap. 6.1)

5.8.3 Sonstige Vektoren

Bezeichnung	Konstrukt (Hersteller)
d2EGFP	p21-d2EGFP (siehe Kap. 6.1)
GST- Y163fs2* 1-342aa	Y163fs2* 1-342aa/pGEX-2TK (siehe Kap. 6.1)
GST-H187Y 1-342aa	H187Y 1-342aa/pGEX-2TK (siehe Kap. 6.1)
GST-N212delN 1-342aa	N212delN 1-342aa/pGEX-2TK (siehe Kap. 6.1)
GST-T210delT 1-342aa	T210delT 1-342aa/pGEX-2TK (siehe Kap. 6.1)
GST-TBX3 1-342aa	TBX3 1-342aa/pGEX-2TK (siehe Kap. 6.1)
maxGFP	pmaxGFP™(Amaya)

Konstrukt (Hersteller)

p21-FLuc (siehe Kap. 6.1)

p21-GLuc (siehe Kap. 6.1)

pCMV-Gluc (New England Biolabs)

pEF1 α -Tet3G (Promega)

pGL3-Control (Promega)

pGL4.74 (Promega)

pTK-Hyg (Promega)

pTRE3G-d2EGFP (Clontech)

pTRE3G-Luc (Clontech)

pTRE3G-TBX2 (3xFLAG, siehe Kap. 6.1)

5.9 Primer**5.9.1 Zur Mutagenese verwendete Primer**

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
1377	TBX2-GR121-122ASmut-for	GGTCATCACCAAGTCCGCTAGCCGGATGTTCCCCCCTTC
1378	TBX2-GR121-122ASmut-rev	GAAGGGGGGAACATCCGGCTAGCCGACTTGGTGATGACC
1379	TBX3-GR129-130ASmut-for	GTCATTACCAAGTCGGCTAGCCGAATGTTTCCTCATTAAAA AG
1380	TBX3-GR129-130ASmut-rev	CTTTAAATGGAGGAAACATTCGGCTAGCCGACTTGGTAATGA AC
1518	TBX3-CtBP2mut-for	CCAACAGTTCTTCAACGGGCACGGCCTCTTCGCCACCCCAG CCAGTTTGC
1519	TBX3-CtBP2mut-rev	GCAAACCTGGCTGGGGTGGGCGAAGAGCCGTGCCCGTTGAAG AACTGTTGG
1520	TBX3-CtBP3mut-for	CGTCCGCGGCCACCCTGGGCTTCCACGCCAGCAGCACGTCC TGG
1521	TBX3-CtBP3mut-rev	CCAGGACGTGCTGCTGGGCGTGGAAGCCCAGGGTGGCCGCGG ACG
1524	TBX3-CtBP1mut-for2	GCGGCGCTCTCGCTGAATGGCGCCAATGCCAAGCCGATCATG
1525	TBX3-CtBP1mut-rev2	CATGATCGGCTTGGCATTGGCGCCATTCAGCGAGAGCGCCGC
1560	TBX3-N212del-for	CCACAACTGAACTCACCAACATTTTCAGACAAACATGG

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
1561	TBX3-N212del-rev	CCATGTTTGTCTGAAATGTTGGTGAGTTTCAGTTTGTGG
1562	TBX3-Y163fs2*-for	GCTGCTGATGACTGTCGTTTATAAATTCACAATTCTCGG
1563	TBX3-Y163fs2*-rev	CCGAGAATTGTGAAATTTATAAACGACAGTCATCAGCAGC
1564	TBX3-T210del-for	CGTCACTTTCCACAAACTGAAACTCAACAACATTTTCAGACAA ACATGG
1565	TBX3-T210del-rev	CCATGTTTGTCTGAAATGTTGTTGAGTTTCAGTTTGTGGAAA GTGACG
1566	TBX3-Y149Sfor	GGGCTGGATAAAAAAGCCAAATCCATTTTATTGATGGACATT ATAGCTGC
1567	TBX3-Y149Srev	GCAGCTATAATGTCCATCAATAAAATGGATTTGGCTTTTTTA TCCAGCCC
1568	TBX3-D275Kfor	GATAAGATAACCCAGTTAAAAATAAAGAACAACCCTTTTGCA AAAGG
1569	TBX3-D275Krev	CCTTTTGCAAAAGGGTTGTTCTTTATTTTAACTGGGTTATC TTATC
1572	TBX3-LALAfor	CAGCTCACCCCTGCAGTCCGCGAGGGCGTTTGATGAAAGACAC AAAAAGG
1573	TBX3-LALArev	CCTTTTTGTGTCTTTTCATCAAACGCCCTCGCGGACTGCAGGG TGAGCTG
1668	TBX3-GroBSmut-for	CGGGCGCCGGACTACGCCATGAGCGCGGCGACCGGTCACCAG CCG
1669	TBX3-GroBSmut-rev	CGGCTGGTGACCGGTCGCCGCGCTCATGGCGTAGTCCGGCGC CCG
1784	TBX3-H187Y-for	CCAAAGAGGATGTACATTTACCCGACAGCCCCGCTACTG
1785	TBX3-H187Y-rev	CAGTAGCGGGGCTGTCCGGTAAATGTACATCCTCTTTGG
1786	TBX3-S674A-for	GGACTCGGGCTCTGAACTCAACGCCGCTCCTCCACGCTCTC C
1787	TBX3-S674A-rev	GGAGAGCGTGGAGGAGCGGGCGTTGAGTTCAGAGCCCGAGTC C

5.9.2 Zur Herstellung von Konstrukten verwendete Primer

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
1322	p21-1for-BgIII	ACACAAGATCTGCTTGGGCAGCAGGCTGT
1323	p21-2319rev-HindIII	ACACAAAGCTTCTGACTTCGGCAGCTGCT
1357	p21-1for-XhoI	ACACACTCGAGGCTTGGGCAGCAGGCTGT
1358	p21-2319rev-SacII	ACACACCGCGGCTGACTTCGGCAGCTGCT
1438	TBX2-pTRE3G-for	CCCTCGTAAAGTCGACatggcttaccacccggtcca
1439	TBX2-pTRE3G-rev	CAGTTACATTGGATCctcactacttgtcatcgtcat
1808	p21-1for-KpnI	ACACAGGTACCGCTTGGGCAGCAGGCTGT
1879	TBX3-1for-BamHI	CTCAGAGGATCCATGAGCCTCTCCATGAGAGATCCG
1880	TBX3-1004rev-Sall	TCTGAGGTCGACCTATCATTCACTGGAGGACTCATCAGAGG

5.9.3 Zur Sequenzierung verwendete Primer

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
960	pUC2455	ATAAGGGCGACACGAAATGT
1024	TBX2-1for	atggcttaccacccggtccac
1036	TBX2-437for	ACATTGTAGCCGCTGACGATT
1037	TBX3-1812rev	GCTGCGGCCATGTACGTGTAG
1038	TBX3-749for	CCCGGTTCCACATTGTAAGAG
1039	TBX3-2209rev	TCAGGCGTAATCGGGCACATCGTAGGGGTACGGGGACGCGCT GCGGGACCT
1066	TBX2-410rev	agtcagcggcctggacaa
1067	TBX2-916for	GATGGCGCGGAGTCAGAC
1068	TBX3-375rev	ATGGTTCAGCCCTTCCGC
1069	TBX3-357for	GGGACCGAGATGGTCAT
1131	M13rev	CAGGAAACAGCTATGAC
1132	M13for	CTGGCCGTCGTTTTAC
1337	pGLuc924-rev	TCAGGGCAAACAGA ACTTTGACTC
1338	pGLuc5595-for	GAATAAGGGCGACACGAAAT
1396	EGFP-2rev	GCTCCTCGCCCTTGCTCACCA
1678	GST589for	AAGTATATAGCATGGCCTTT
	pGEX2T seq primer	CCTCTGACACATGCAGCTCCCGG

5.9.4 Zur qPCR verwendete Primer

Nr.	Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
1760	bAktin-801-for	TCTTCCAGCCTTCCTTCCTG
1761	bAktin-909-rev	CAATGCCAGGGTACATGGTG
1924	TBX3-687-for	TCCCAAGTGATCACGCTACG
1925	TBX3-836-rev	CTGGTATGCAGTCACAGCGA
1772	P21-568-for	CAGCAGAGGAAGACCATGTG
1773	P21-670-rev	GTGGTAGAAATCTGTCATGCTG

5.10 Mikrobiologische Methoden

5.10.1 Chemische Hitzeschock-Transformation von Bakterien

Diese Methode dient der bakteriellen Vervielfältigung von Plasmiden. Sie basiert auf der bakteriellen Fähigkeit aufgenommene Plasmide autonom und in großer Anzahl replizieren zu können. Pro Transformationsansatz wurde ein Aliquot von chemisch kompetenten Zellen benötigt. Die Transformation erfolgte entsprechend dem Herstellerprotokoll. Das im Folgenden beschriebene Protokoll ist ein zur Transformation verwendetes Standardprotokoll für NEB10 beta (New England Biolabs) und kann für andere, der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten, kommerziell erworbenen Bakterienstämme (z.B. XL10-Gold, BL21DE3) abweichen. Die bei -80°C gelagerten Aliquots wurden zunächst für 5-10 min auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der Plasmid-DNA (max. 50 ng) folgte nach kurzem Mischen eine 30 min Inkubation auf Eis bevor die Bakterien einem 30 s Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt wurden. Nach weiteren 2 min auf Eis wurden 250 μl SOB-Medium hinzugefügt und die Bakterien für 1 h bei 37°C auf einem Schüttler bei 200 - 225 rpm inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen auf angewärmte LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Hierzu wurden die Bakterien auf zwei LB-Agarplatten aliquotiert (100 μl /Rest), welche das zur Selektion der mit Plasmid-DNA transformierten Bakterien notwendige Antibiotikum enthielten. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 4°C .

5.10.2 Kultivierung von Bakterien

Zur Anzucht wurden die Bakterienstämme auf LB-Agarplatten ausgestrichen, bei 37°C über Nacht kultiviert und im Anschluss bei 4°C gelagert. Die Flüssigkulturen wurden

in LB-Medium bei 37°C auf einem Schüttler bei 200 - 225 rpm für maximal 16 h inkubiert und ebenfalls bei 4°C gelagert. Das Animpfen der Flüssigkulturen erfolgte durch Übertragen einer auf einer LB-Agarplatte gewachsenen Einzelkultur oder aus einer bei -80°C gelagerten Glycerin-Dauerkultur. Zur Kultivierung von mit Plasmid-DNA transformierten Bakterienstämmen wurden LB-Agar und LB-Medium mit selektiven Antibiotika angereichert.

5.10.3 Glycerin-Dauerkulturen zur Konservierung von Bakterien

Die Langzeitlagerung von Bakterien erfolgte bei -80°C. Hierzu wurde eine über Nacht gewachsene Flüssigkultur 1:1 mit sterilem Glycerol (99 %) in einem Kryogefäß gemischt. Zur Entnahme wurde die Kultur mit einer autoklavierten Pipettenspitze angekratzt und zum Animpfen einer Kultur in vorbereitetes Nährmedium überführt.

5.11 Molekularbiologische Methoden

5.11.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine molekularbiologische Methode zur gezielten Verfielfältigung von DNA-Sequenzen.^[143,144] Hierbei definieren zwei kurze Oligonukleotidsequenzen (i.d.R. 18 - 30 Basen) den zu amplifizierenden Bereich der DNA. Da die Oligos ihre Template-DNA nur als Einzelstrang erkennen und binden, ist ein anfängliches Erhitzen der Reaktion notwendig (Denaturierung). Aufgrund der Komplementarität zur Matrizen-DNA hybridisieren die Primer in gegenläufiger Orientierung (Annealing), so dass bei der enzymgesteuerten DNA-Synthese (Elongation) nur der von den Primern flankierte DNA-Bereich amplifiziert werden kann. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden chemisch von der Firma Sigma Aldrich synthetisiert und sind in Kap. 5.9 aufgelistet.

5.11.1.1 Standard-PCR

PCR-Reaktionen wurden mit den in Kap. 5.5 aufgelisteten Enzymen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Cyclerprogramm wurde an das Herstellerprotokoll des verwendeten Enzymsystems angepasst.

5.11.1.2 Linker-PCR

Die Linker-PCR ist eine Standard-PCR, bei der über die verwendeten Oligos gezielt Restriktionsschnittstellen in das Amplikon eingefügt werden, welche die gerichtete Ligation des Amplikons in ein Plasmid erleichtern.

5.11.1.3 Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR ermöglicht den gezielten Austausch einzelner Basen innerhalb einer bekannten Plasmidsequenz. Hierbei integriert das Primer-Design die in die Zielsequenz einzuführende Mutation. Die Mutagenese-Primer haben eine Länge von 25-45 Basen und hybridisieren von beiden gegenüberliegenden Seiten an denselben DNA-Abschnitt. Die PCR-Reaktion wurde mit dem QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit von Agilent Technologies nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei entgegen der Herstellerangaben 500 ng Template-DNA eingesetzt wurden. Durch die im Primerpaar integrierte Mutation wurde während der PCR-Reaktion ausschließlich mutantes Plasmid synthetisiert. Da nur dieses von weiterem Interesse war, wurde im Anschluss an die PCR-Reaktion ein DpnI-Verdau durchgeführt, gefolgt von einer ethanolischen Fällung (siehe Kap. 5.11.11). Da DpnI ausschließlich methylierte DNA-Stränge wie das unmutierte Templateplasmid restringiert, sollte bei der anschließenden Transformation hauptsächlich mutiertes Plasmid von den XL10-Gold Bakterien aufgenommen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels Mutationen in den codierenden Bereich der TBX2- sowie der TBX3-DNA-Sequenz eingeführt mit dem Ziel Rückschlüsse auf die Funktionalität des mutierten Proteins machen zu können. Zudem ermöglicht die Mutagenese-PCR die Reparatur fehlerhafter Plasmidsequenzen.

5.11.1.4 Mykoplasmen-PCR

Die Kontamination mit Mykoplasmen ist eines der häufigsten Probleme der Zellkultur und ca. 15 - 35 % aller Zellkulturen sind mit Mykoplasmen kontaminiert.^[145] Mykoplasmen sind in der Natur häufig vorkommende sehr kleine ($< 0,2 \mu\text{m}$ Durchmesser) parasitierende Bakterien der Klasse *Mollucutes*.^[146] Einige Mykoplasmenarten sind pathogen für Mensch und Tier. Aufgrund der fehlenden Zellmembran sind Mykoplasmen pleiomorph. Diese starke Formflexibilität begünstigt u.a. die Passage von Sterilfiltern. Daher werden My-

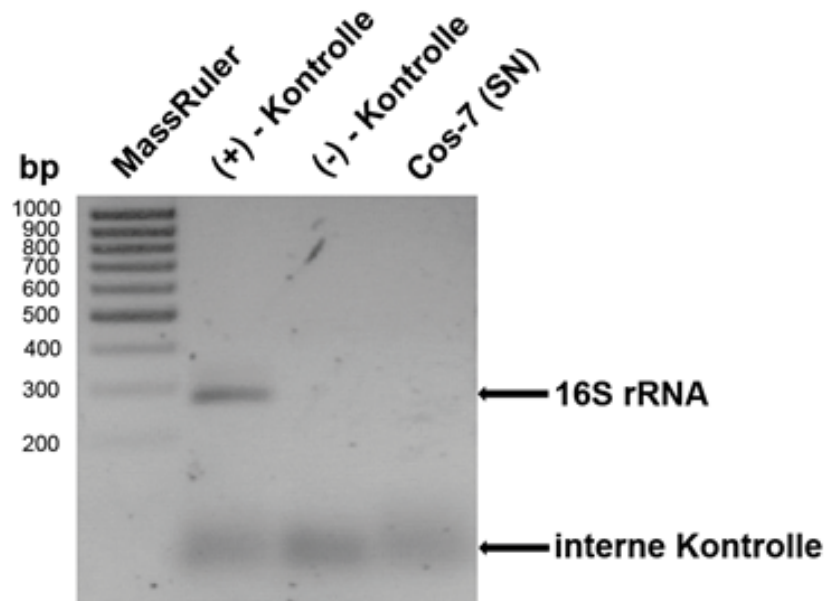


Abbildung 5.1: Überprüfung der COS-7-Zellkultur auf Mykoplasmen. Nach Durchführung der Mykoplasmen-PCR entsprechend Kap. 5.11.1.4 wurde die DNA in einem 2%-igen Agarosegel getrennt. Die Dokumentation der DNA erfolgte unter UV-Licht nach einer Inkubation im Ethidiumbromidbad. Als Größenstandard wurden 5 μ l MassRuler aufgetragen. bp, Basenpaare. SN, Zellüberstand.

koplasmeninfektionen innerhalb eines Labors häufig von Kulturflasche zu Kulturflasche übertragen. Eine chronische Mykoplasmeninfektion beeinträchtigt nicht nur Stoffwechsel und Wachstum der kontaminierten Zellkulturen sondern auch deren biochemische und immunologische Eigenschaften. Hier wurden Zellkulturen mit Hilfe des Venor™ GeM Mycoplasma Detection Kits von Sigma Aldrich auf potentielle Kontamination von Mycoplasma und Ancholeplasma hin überprüft (Durchführung entsprechend der Herstellerangaben). Bei dieser PCR-Methode wird spezifisch die hoch konservierte 16S rRNA des Mykoplasmen-genoms amplifiziert. Das PCR-Produkt hat eine Größe von 270 bp (siehe Abb 5.1). Die Reaktion ist hoch sensitiv, so dass 1-5 fg Mykoplasmen-DNA (2-5 Mykoplasmen pro Ansatz) für ein positives Ergebnis ausreicht. Zur Durchführung der Mykoplasmen-PCR wurde der Überstand von adhärennten COS-7-Zellen mit 90 bis 100%-iger Konfluenz gesammelt. Dieser wurde vor dem Ansetzen der PCR-Reaktion 5min bei 95°C aufgeköcht und anschließend für 1 min bei 13.200 rpm zentrifugiert. Zusätzlich wurde eine Reaktion mit ddH₂O als Negativ-Kontrolle angesetzt, sowie eine dem Kit enthaltene Positiv-Kontrolle. Eine jeder Reaktion beigefügte interne Kontrolle zeigte, ob die PCR funktioniert hat. Diese ist als 191 bp-Bande im anschließenden Agarosegel erkennbar (siehe Abb. 5.1).

5.11.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Vor der experimentellen Weiterverwendung müssen die PCR-Produkte von Enzymen, Primern, Salzen und dNTPs getrennt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Amplikons und vektorielle DNA-Fragmente zwischen 0,1 und 10 kb mit Hilfe des High Pure PCR Product Purification Kits (Roche) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt.

5.11.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode zur Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von Nukleinsäuren (DNA oder RNA). Die im Gel enthaltene Agarose bildet nach Polymerisation ein Porennetzwerk. Je höher die Agarosekonzentration desto kleiner die Poren und umgekehrt. Somit lassen sich die auf ein Gel aufgetragenen DNA-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Größe im elektrischen Feld voneinander trennen. Hierbei wandern kleinere Moleküle schneller durch das Gel als größere, da die Wanderungsgeschwindigkeit linearer doppelsträngiger DNA-Moleküle durch das elektrophoretische Feld umgekehrt proportional zum \log_{10} ihrer Molekulargewichte ist.^[147] Die in dieser Arbeit verwendeten Agarosegele wurden mit 1x TBE-Puffer angesetzt, welcher auch als Laufpuffer diente. Nach der Auftrennung der Fragmente, wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Färbelösung inkubiert. Da Ethidiumbromid in die DNA interkaliert, war die Visualisierung der DNA-Banden unter ultraviolettem Licht (UV)-Licht möglich. Die Größe der Fragmente wurde durch den mitgelaufenen Längenstandard MassRuler™ DNA ladder Mix (Thermo Scientific) kontrolliert.

5.11.4 Gelextraktion

Mittels Gelextraktion können gezielt DNA-Fragmente bestimmter Längen aus einem DNA-Gemisch isoliert werden, wie z.B. nach Restriktion oder PCR. Hierzu wurden die gewünschten DNA-Fragmente nach erfolgter Elektrophorese unter UV-Licht sorgfältig aus einem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit (QIAGEN) gemäß den Herstellerangaben gereinigt.

5.11.5 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen schneiden die DNA innerhalb spezifischer Sequenzen. Dies ermöglicht die gezielte Herstellung von DNA-Fragmenten, welche isoliert zu neuen Konstrukten zusammengesetzt werden können. Hierbei können glatte oder überhängende Doppelstrangenden entstehen. Da überhängende Enden die Ligation erleichtern, wurden in dieser Arbeit ausnahmslos Überhang-produzierende Enzyme eingesetzt. Die Durchführung des Restriktionsverdaus erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

5.11.6 Ligation

Bei der Ligation werden zwei lineare DNA-Doppelstränge miteinander verknüpft, indem das Enzym Ligase die Veresterung einer 3'-Hydroxylgruppe mit einem 5'-Phosphatsäureester unter Verbrauch von ATP katalysiert. Die Enden der Doppelstränge können glatt oder überhängend (kohäsiv) sein, wobei überhängende Enden zwingend zueinander komplementär sein müssen. Überhängende Enden erleichtern die gerichtete Ligation eines Inserts in einen Zielvektor nach einem Doppolverdau. Der Ligationsansatz mit der T4-DNA-Ligase (Invitrogen) erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Dabei wurden Vektor und Insert im molaren Verhältnis von 1:3 gemischt und über Nacht bei 18°C inkubiert. Die DNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe des internetgestützten NEB tools (<http://tools.neb.com/>) ermittelt. Zur Konzentrierung und Reinigung der DNA vor der bakteriellen Transformation erfolgte eine ethanolische Fällung (siehe Kap. 5.11.11).

5.11.7 LR-Rekombination

Die Gateway Technologie von Invitrogen ermöglicht eine schnelle gerichtete Klonierung von DNA-Fragmenten unter Gebrauch des Rekombinationssystems des Bakteriophagen λ in Unabhängigkeit zu Restriktionsschnittstellen. Die Rekombination erfolgt zwischen den modifizierten „attachment (*att*) sites“. Im sog. ENTRY-Vektor (hier: pENTRTM/D-TOPO) flankieren attL1 und attL2-Rekombinationsstellen das zu untersuchende Gen. Bei der LR-Rekombination findet ein enzymkatalysierter Gentransfer zwischen den attL1/attL2-Bereichen des Entry-Vektors und den attR1/attR2-Bereichen des Destinations-Vektors (hier: pT-REx-DEST30) statt. Die Selektion basiert auf dem gleichzeitigen Austausch des in der *attR*-Kassette enthaltenen Suizid-Gens *ccdB*, dessen Expression zur Hemmung der

E. coli-DNA-Gyrase führt. Folglich können transformierte Bakterien nur dann Kolonien bilden, wenn ihr aufgenommenes Plasmid bei entsprechender Resistenz kein *ccdB*-Gen enthält.

5.11.8 In-Fusion-Cloning

Das In-Fusion HD Cloning Kit von Clontech ermöglicht die schnelle und gezielte Klonierung von DNA-Fragmenten in den Zielvektor. Zunächst wird der Vektor an der Insertionsstelle linearisiert und aufgereinigt. Die zur Amplifikation des Inserts verwendeten PCR-Primer werden so konstruiert, dass diese 15 bp-Überhänge besitzen, welche komplementär zu den jeweiligen Enden des linearisierten Vektors sind. Die 15 bp-Überhänge werden von dem In-Fusion Enzym erkannt und mit den komplementären Enden des linearisierten Vektors fusioniert.

Im Anschluss an die In-Fusion Cloning Reaktion wurde 2 µl Ansatz in chemisch kompetente *E. coli* transformiert (siehe Kap. 5.10.1) und die Plasmide von über Nacht gewachsenen Kolonien isoliert.

5.11.9 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur präparativen Gewinnung der nach Transformation bakteriell vervielfältigten Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit manuelle und kommerzielle Verfahren angewendet. War der Reinheitsgrad der DNA zur Weiterverwendung unwichtig, wurde die günstige manuelle Methode angewendet. Ein höherer Reinheitsgrad wurde durch die Plasmidpräparation mit Hilfe kommerzieller Kits über Ionenaustauschersäulen gewährleistet.

5.11.9.1 Manuelle Plasmidpräparation

Die zur Durchführung der manuellen Minipräparation verwendeten Puffer stammten aus dem kommerziellen Minipräparations Kit von QIAGEN. Das Pellet aus 3 ml über Nacht gewachsener Bakterienkultur wurde in 200 µl P1-Puffer resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Zugabe von 200 µl P2-Puffer und zur Neutralisierung wurden 350 µl P3-Puffer hinzugegeben. Zwischen jedem Schritt wurden die Lösungen durch Invertieren der 1,5 ml Gefäße gründlich gemischt. Nach 2 min Zentrifugation bei 13.200 rpm und RT wurde der

Überstand in ein neues 1,5 ml Tube übertragen und erneut zentrifugiert. Nach zweimaliger Wiederholung erfolgte eine ethanolische Fällung der DNA (siehe Kap. 5.11.11).

5.11.9.2 Kommerzielle Plasmidpräparation

Mittels kommerziellen Kits können Plasmide in großen Mengen und in hohem Reinheitsgrad gewonnen werden. Welches Kit verwendet wurde, richtete sich nach der benötigten Plasmidmenge. Minipräparation wurden mit dem Plasmid Mini Kit von QIAGEN oder GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit von Sigma-Aldrich durchgeführt, wenn beispielsweise für eine zur Überprüfung des Plasmids via Sequenzierung nur eine geringe Plasmid-Menge benötigt wurde. Größere Plasmidmengen wurden mit dem Sigma-Aldrich sowie dem Plasmid Maxi Kit von QIAGEN. Sollten die Plasmide frei von Endotoxinen sein, wie es für die zelluläre Transfektion von Vorteil ist, so wurde das Endofree Maxipräparation Kit von QIAGEN verwendet. Die kommerzielle Plasmidpräparation folgte gemäß den Herstellerangaben.

5.11.10 Phenol-Chloroform-Extraktion

Um DNA-Lösungen von störenden Enzymen zu befreien wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde die DNA-Lösung mit ddH₂O auf ein Volumen (Vol.) von 300 µl aufgefüllt und mit 1 Vol. Phenol versetzt. Nach 2 min Vortexen und 2 min Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit und RT bildete das Gemisch zwei Phasen, wobei die untere phenolhaltige Phase verworfen wurde. Zur oberen DNA-haltigen wässrigen Phase wurde 1 Vol. Chloroform/Isopentanol (24:1) gegeben. Nach 30 s Vortexen und 30 s Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit und RT bildete das Gemisch erneut zwei Phasen, wobei die untere Phase verworfen wurde. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Der Phenol-Chloroform-Extraktion folgte eine ethanolische Fällung der in der oberen Phase enthaltenen DNA (siehe Kap. 5.11.11).

5.11.11 Ethanolische Fällung von Nukleinsäuren

Eine ethanolische Fällung befreit DNA-Lösungen von störenden Puffersubstanzen, Salzen und Enzymen und ermöglicht zugleich die Aufkonzentrierung von DNA-Lösungen. Die Fällungsreaktion erfolgte in einem 1/10 Vol. an 3 M Natriumacetat und dem 2,5-fachen

Vol Ethanol (100 %) bei -20°C für mindestens 1 h. Das Natriumacetat neutralisiert das negativ geladene Rückgrat der DNA, während das Ethanol der DNA die Hydrathülle entzieht, wodurch diese unlöslich wird und ausfällt. Die Pelletierung der DNA erfolgte durch Zentrifugation bei 13.200 rpm für 30 min bei 4°C. Das DNA-Pellet wurde nach Zugabe von 500 µl Ethanol (70 %) für 1 min bei 13.200 rpm und 4°C gewaschen. Nach Entfernen des Ethanols wurde das DNA-Pellet bei 37°C getrocknet. Im Anschluss wurde das ethanolfreie DNA-Pellet in TE-Puffer oder dest. Wasser resuspendiert.

5.11.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren (DNA und RNA) erfolgte mittels Nanodrop 2000 von Thermo Scientific gemäß den Herstellerangaben.

5.11.13 Sequenzierung

Zur Überprüfung von DNA-Sequenzen erfolgte eine Sequenzierung nach Sanger^[148] durch die Firma Genterprise Genomics (Mainz). Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit dem Programm Chromas Lite 2.1 kontrolliert. Die Überprüfung der Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe des internetgestützten NCBI-Blast gegen eine bekannte Referenzsequenz.

5.11.14 RNA-Isolierung

Die Isolation von RNA ermöglicht eine Aussage zur Genaktivität der Zellen zum Zeitpunkt der Lyse und ist eine wichtige Methode der Molekularbiologie. Im Rahmen dieser Arbeit wurde RNA aus Zelllysaten transient transfizierter Zellen (siehe Kap. 5.12.5) 48 h nach Transfektion mit Hilfe des kommerziellen RNeasy Kits von QIAGEN gemäß den Herstellerangaben isoliert. Die Lyse und Homogenisierung der Zellen erfolgte im hochdenaturierenden RLT+-Puffer. In diesem Milieu werden RNasen direkt inaktiviert, was ein hohes Maß an intakter RNA nach der Aufreinigung gewährleistet. Im Säulenformat wurde die RNA hoch-effizient an eine spezielle Silika-Membran gebunden und in verschiedenen Waschschritten von Kontaminaten befreit, so dass bei der Elution in 30-50 µl Wasser qualitativ hochwertige RNA erhalten wird.

5.11.15 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels des Superscript III First-Strand Synthesis Systems für RT-PCR von Invitrogen mit Oligo(dT) Primern nach Anleitung des Herstellers. Hierbei wurde aus einzelsträngiger RNA aus Zelllysaten mittels des Enzyms Reverse Transkriptase wieder doppelsträngige cDNA synthetisiert.

5.11.16 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die Methode der quantitativen PCR basiert auf dem gleichen Prinzip wie die konventionelle PCR mit dem Vorteil, dass die Menge an gebildetem PCR-Produkt in Echtzeit (Real-time, RT-PCR) gemessen werden kann^[149]. Die Detektion der gebildeten Amplikons wird durch Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green ermöglicht. Dieser bindet relativ unspezifisch an die fertig synthetisierten DNA-Doppelstränge. Dadurch ist das Fluoreszenzsignal während der exponentiellen Phase der PCR proportional zur gebildeten Produktmenge.

Der verwendete SYBR Green Mix KAPA SYBR FAST ABI Prism von Peqlab enthält neben dem SYBR Green-Farbstoff auch die für die Reaktion notwendigen Puffer, dNTPs und die DNA-Polymerase.

qPCR-Ansatz:

10 µl SYBR Green Mix
0,1 µl Primer 1
0,1 µl Primer 2
2 µl cDNA (100 ng/µl)
mit dest. Wasser auf 20 µl auffüllen

Thermocyclerprogramm:

Hold 20 s 95°C
Cycling (40x) 3 s 95°C
30 s 60°C
Schmelzkurve 15 s 95°C
1 min 60°C

Die Reaktionen wurden in Mastermixen angesetzt. Nach Bestimmung der cDNA-Konzentration mittels Nanodrop2000 wurde diese in 100 ng/µl-Ansätzen bei -20°C gelagert. Die Messung erfolgte in Triplikaten in 96 Well-Platten mit dem StepOnePlus™ Real Time PCR-System von Applied Biosystem.

Um sicherzustellen, dass bei der Reaktion nur das gewünschte PCR-Produkt amplifiziert wurde, erfolgte am Ende der Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse durch langsame Temperaturerhöhung von 60°C auf 95°C. Bei vollständiger Denaturierung des DNA-Doppelstrangs kann für jedes Amplikon bei einer spezifischen Schmelztemperatur eine Fluoreszenzabnah-

me detektiert werden.

Im Anschluss an die PCR wurde mittels der zugehörigen StepOnePlus™-Software automatisch aus den erhaltenen Daten ein Amplifikationsplot erstellt. Hierbei handelt es sich um eine exponentielle Kurve, welche sich aus der Anzahl der PCR-Zyklen auf der X-Achse und der gemessenen Fluoreszenzintensität auf der Y-Achse ergibt. Der C_T (engl.: cycle threshold) bezeichnet den PCR-Zyklus, bei dem die Menge des gebildeten PCR-Produkts ausreicht um ein Fluoreszenzsignal zu erhalten, welches die Schwelle des Hintergrundsignals überschreitet und die PCR anschließend in die exponentielle Phase übergeht. Zur relativen Quantifizierung wurden die $\Delta\Delta C_T$ berechnet.

5.12 Zellbiologische Methoden

5.12.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die Zellkulturarbeiten fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die Lagerung der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂. Die Zellkulturmedien wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die COS-7-Zellen wurden als adhärenente Einschicht-Kulturen in 25 cm² oder 75 cm² großen Plastik-Gewebekulturflaschen angezogen. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10 % Fötalem Kälber Serum (FCS) angereichert. Zusätzlich wurde 1 % Penizillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml, PS) zur Vermeidung bakterieller Kontaminationen bei der Langzeitkultur hinzugefügt.

5.12.2 Passagieren von adhärenenten Säugerzellen

Adhärenente Zellen wie COS-7 wachsen als konfluente Monolayer auf der Wachstumsfläche von speziellen Zellkulturflaschen. Bei zu hoher Zelldichte nimmt die Proliferationsrate stark ab, da das Nährstoffangebot sowie der PH-Wert des Nährmediums stark sinken. Da dies im schlimmsten Fall zu einem Absterben der Kultur führt, war es wichtig die Zelldichte einer Kulturflasche durch regelmäßiges Passagieren auszudünnen. Hierzu wurden adhärenente Zellen durch die enzymatische Trypsin-Reaktion aus dem Monolayer herausgelöst. Da im Nährmedium enthaltenes FCS die Trypsin-Reaktion unterbindet, wurde der Zellrasen zuvor einmal mit Dulbecco's PBS (PBS) gewaschen. Nach 5 - 10 min Inkubation in

0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA wurden die COS-7-Zellen durch sanftes Abklopfen der Zellkulturflasche von der Wachstumsfläche gelöst, mit PBS in Suspension gebracht und in einer Verdünnung von 1:20 in Zellkulturflaschen mit frischem Nährmedium überführt. Die Häufigkeit des Passagierens richtete sich nach der Wachstumsgeschwindigkeit.

5.12.3 Bestimmung der Zellzahl mit der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer

Zur Reproduzierbarkeit von Zellkulturexperimenten wurden diese bei einer nahezu konstanten Zellzahl durchgeführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Hierzu wurden die Zellen wie in Kap. 5.12.2 beschrieben in Suspension gebracht und in 15 ml Reaktionsgefäßen für 5 min bei 0,3 rcf pelletiert. Das Zellpellet wurde in einem adäquaten Volumen an antibiotikafreiem DMEM mit 10 % FCS resuspendiert. Nach gründlichem Mischen wurden ca. 20 µl Zellsuspension auf die vorbereitete Zählkammer überführt. Nach kurzer Inkubationszeit wurden 2-4 Quadrate ausgezählt und die durchschnittliche Zellzahl pro 1 ml Zellsuspension berechnet.

$$\begin{aligned} \text{Anzahl der Zellen pro 1 ml} &= \text{Mittelwert der Zellzahl der ausgezählten Quadrate} \\ &\quad \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10.000 \end{aligned}$$

5.12.4 Kryokonservierung und Auftauen von Säugerzellen

Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in flüssigen Stickstoff (N₂). Um die Lebensfähigkeit der Zellen zu bewahren, sollte die zellschädigende Bildung von Eiskristallen während des Einfrierprozesses vermieden werden. Dies gelang durch Zugabe des Frostschutzmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) zum Einfriermedium. Da auch FCS einen gewissen Gefrierschutz gewährleistet, erfolgte die Kryokonservierung der Zellen in 10 % DMSO-haltigem FCS-Einfriermedium. Vor dem Einfrieren wurden die Zellen wie in Kap. 5.12.2 beschrieben in Suspension gebracht und in 15 ml Reaktionsgefäßen für 5 min bei 0,3 rcf pelletiert. Das Pellet wurde im benötigten Vol. Einfriermedium resuspendiert und auf spezielle Kryogefäße verteilt. Diese wurden vor der Langzeitlagerung in N₂ für maximal 24 h in einer Styroporbox bei -80°C tiefgefroren. Zur Rekultivierung der kryokonservierten Zellen, wurde das Kryogefäß kurz bei 37°C im Wasserbad erwärmt und die Zellen in 10 ml PBS in

15 ml Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 0,3 rcf pelettiert. Um das gesamte DMSO zu entfernen, folgten zwei weitere Waschstreps mit PBS bevor das Zellpellet in frischem Nährmedium resuspendiert in eine Kulturflasche überführt wurde. Da DMSO über die Zeit bei höheren Temperaturen toxisch wirkt, war eine rasche Durchführung notwendig.

5.12.5 Transfektion von Säugerzellen

Bei einer Transfektion wird zellfremde DNA mittels chemischen und/oder physikalischen Methoden in eine Zielzelle eingeschleust. Dies ist sowohl transient als auch stabil möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Transfektionen mit Hilfe des FuGENE® HD Transfection Reagent von Promega in DMEM mit 10 % FCS durchgeführt.

5.12.5.1 Transiente Transfektion

Bei der transienten Transfektion liegt die eingeschleuste DNA extrachromosomal vor und verbleibt nur für einen begrenzten Zeitraum in der Wirtszelle. Transiente Transfektionen sind schnell und einfach in großem Maßstab durchzuführen und haben den Vorteil der schnellen Daten-Generierung.

Am Tag vor der Transfektion wurden 10^5 /ml COS-7-Zellen in antibiotikafreiem DMEM mit 10 % FCS-Transfektionsmedium ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ bis zu einer idealen Konfluenz von 70-90 % adhären gelassen. Die transiente Transfektion mit dem FuGENE HD-Transfektionsreagenz folgte dem Hersteller-Protokoll FuGENE HD Transfection Reagent (Promega). Zur Transfektion wurde das alte Medium gegen 950 µl/ml frisches Transfektionsmedium ersetzt. FuGENE HD wurde vor Gebrauch auf RT erwärmt und durch kurzes Vortexen gründlich gemischt. Die Transfektionsansätze enthielten 0,5 µg/ml bzw. 1 µg/ml Gesamt-DNA in 47 µl/ml DMEM ohne Zusätze. Nach Zugabe von 3 µl/ml FuGENE HD wurden die Transfektionsansätze durch kurzes Vortexen gründlich gemischt und kurz zentrifugiert. Nach 10 min Inkubation zur Bildung der Transfektionskomplexe wurden 50 µl/ml Ansatz zu 950 µl/ml Transfektionsmedium ausplattiert. In der Regel wurden dreifach Bestimmungen in einem Mastermix transfiziert und das Experiment mehrmals wiederholt. Zur Zielgenexpression wurden die Zellen für 24-48 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

5.12.5.2 Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion wird die aufgenommene Plasmid-DNA in das zelluläre Genom integriert, und die darin enthaltene genetische Information bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Durch das zusätzlich im Vektor codierte Resistenzgen überleben ausschließlich nur plasmidhaltige Zellen die Antibiotikaselektion. Das Ziel der stabilen Transfektion ist die Isolation und die Expansion der selektierten Einzelklone. Diese müssen dann in Folgeexperimenten hinsichtlich der Zielgenexpression überprüft werden. Das Transfektionsprotokoll folgte dem der transienten Transfektion mit FuGENE HD (siehe Kap. 5.12.5.1). Entsprechend dem Hersteller-Protokoll Tet-On® 3G Inducible Expression Systems (Clontech) zur Generierung einer stabilen Zelllinie wurden die Zellen 48 h nach der transienten Transfektion geerntet und in einer Verdünnungsreihe in DMEM mit 10 % FCS und 1 % PS auf 10 cm Petrischalen ausplattiert. 24-48 h später begann die Selektion durch Zugabe des zur Selektion benötigten Antibiotikums ins Medium. Aufgrund der Instabilität der Antibiotika wurde das Selektionsmedium alle drei bis vier Tage erneuert. Selektiert wurde gegen das im transfizierten Expressionsvektor enthaltene oder zusätzlich cotransfizierte Antibiotikaresistenzgen. Die Konzentration des Antibiotikums wurde so gewählt, dass ausschließlich plasmidhaltige Zellen die Selektion überlebten. Diese wuchsen nach ungefähr 14-30 Tagen zu kleinen sichtbaren Kolonien heran. Die Kolonien wurden mit speziellen Klonierungszyklindern geerntet und auf 12 bzw. 24 Well-Platten überführt und expandiert. Die überlebenden Klone wurden unter stetigem Selektionsdruck herangezogen, bis die für Experimente benötigte Konfluenz erreicht war. Die separierten Klone wurden in Folgeexperimenten z.B. mittels Reportergenassay (siehe Kap. 5.12.6) oder Western Blot (siehe Kap. 5.13.4) bezüglich der Zielgenexpression getestet. Positiv getestete Klone wurden in Aliquots kryokonserviert (siehe Kap. 5.12.4).

Selektionsmedium

- für COS-7/pEF1 α -TET3G-Klone: DMEM mit 10 % FCS, 1 % PS und 500 μ g/ml G418
- für COS-7/pEF1 α -TET3G/TBX2-pTRE3G-Klone: DMEM mit 10 % FCS, 1 % PS, 500 μ g/ml G418 und 200 ng/ml HygB
- für COS-7/pEF1 α -TET3G/TBX2-pTRE3G/p21-d2EGFP-Klone: DMEM mit 10 %

FCS, 1 % PS, 500 µg/ml G418, 200 ng/ml) Hyg B und 1 µg/ml Puro

5.12.6 Luciferase-Reporterassay

In der Zellbiologie dienen genetische Reporter zur Analyse der Genexpression. Ein Luciferase-Reporterassay misst die transiente Expression des Luciferase-Reportergens in Zellen, wobei die Luciferase-Aktivität hierbei der Maßstab der transkriptionellen Aktivität des Reportergenkonstrukts ist. Je häufiger die Aktivierung des Promotors, desto mehr Luciferase wurde gebildet. Da Luciferasen ihr Substrat in einer enzymatischen Reaktion umsetzen, führt dies zu einer Signalverstärkung. Häufig dient eine zweite Luciferase als interne Kontrolle. Bei der Umsetzung der Substrate durch die Luciferasen wird Energie in Form von Biolumineszenz frei, welche von einem speziellen Luminometer detektiert und als Relative Light Units (RLU) gemessen werden kann.

Für den Luciferase-Reporterassay wurden die Reportergenkonstrukte mittels transienter Transfektion (siehe Kap. 5.12.5.1) in COS-7-Zellen eingeschleust. Nach 24-48 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Luciferase-Reporterassays für die Messung vorbereitet. Da die Luciferase des Copepoden *Gaussia princeps* (GLuc) in den Überstand sezerniert wird, wurden diese entnommen und bis zur Messung für maximal sieben Tage bei 4°C gelagert. Die Normalisierung des GLuc-Assays erfolgte mittels der aus dem Leuchtkäfer *Photinus pyralis* stammenden Firefly-Luciferase (FLuc) nach Cotransfektion von pGL3-Control. In einem Dual-Luciferase-Reporterassay kann die FLuc-Lumineszenz und die aus *Renilla reniformis* stammende Renilla-Luciferase (RLuc) nacheinander in der gleichen Probe gemessen werden. Zur Messung des FLuc- bzw. des Dual-Assays wurde der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und in 1x Passive Lysis Buffer (Promega) für mindestens 30 min auf einem Schüttler bei RT lysiert. Die Lysate konnten bei -20°C gelagert werden. Die Messung der Luciferase-Aktivität erfolgte am Glomax 96 Well Luminometer mit einem Messvolumen von 20 µl Lysat/SN in weißen 96 Well-Platten. Vor der Messung wurden die Injektorschläuche mit deionisiertem H₂O und Luft durchspült und mit dem jeweiligen Luciferase-Reagenz befüllt. Für die GLuc-Messung wurde das BioLux[®] Gaussia Luciferase Assay Kit von NEB in einem Reaktionsvolumen von 25 µl verwendet. Die FLuc-Aktivität wurde mit dem Luciferase Assay System von Promega in einem Reaktionsvolumen von 25 - 40 µl gemessen. Die Messung des Dual-Reporterassays erfolgte mit dem Dual-

Luciferase[®] Reporter Assay System von Promega in einem Reaktionsvolumen von 40 µl. Bei der Messung dauerte das Premeasurement Delay 2 s und das Measurement 10 s. Nach der Messung wurden die Schläuche dreimal mit deionisiertem Wasser und Ethanol (70 %) gesäubert. Das sog. Priming mit Luft entfernte jegliche Flüssigkeitsreste aus den Injektorschläuchen.

Bei Cotransfektion von zwei Luciferasen wurden die p21-Luciferase-Werte auf die zugehörigen Werte des internen Standards normiert.

5.12.7 Induktion mit Doxyzyklin

Doxyzyklin (Dox) ist der Effektor des von Clontech betriebenen Tet-On 3G-Systems zur regulierbaren Genexpression. Nach Dox-Zugabe wird durch die Aktivierung von Tet-On 3G-Aktivatorprotein die Expression von TRE3G-regulierten Genen induziert. Die Dox-Induktion erfolgte wie im Hersteller-Protokoll Tet-On 3G Inducible Expression Systems (Clontech) beschrieben 4 h nach der Transfektion. Hierzu wurde das Transfektionsmedium gegen Dox-haltiges DMEM mit 10 % FCS und 1 % PS mit bzw. ohne Dox ersetzt.

5.12.8 Überprüfung der Proteinstabilität mittels CHX

Die Behandlung der Zellen mit Cycloheximid (CHX) erfolgte, wie in Griffin *et al.* beschrieben.^[150] Transient transfizierte COS-7 (siehe Kap. 5.12.5.1) wurden 24 h nach der Transfektion mit 25 µg/ml CHX behandelt (0 h) und in Intervallen von 3, 6, 12 und 24 h zur Western Blot-Kontrolle (siehe Kap. 5.13.4) in Harnstoff-Lysepuffer lysiert.

5.12.9 Durchflusszytometrie (FACS)

Das Verfahren der Durchflusszytometrie (FACS, engl.: fluorescence associated cell sorting) dient im Allgemeinen der quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNA. Im Rahmen dieser Arbeit wurden transient GFP-exprimierende Zellen bezüglich ihrer d2EGFP-/GFP-Expression überprüft. Die in 12 bzw. 6 Well-Platten transient transfizierten COS-7 wurden zur FACS-Analyse nach Trypsinierung mit 1 ml PBS in Suspension gebracht und in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen für 2 min bei 1800 rpm pelletiert. Die Zellpellets wurden zweimal mit FACS-Puffer gewaschen

(Zentrifugation 2 min bei 1800 rpm) und anschließend in 200 µl FACS-Fixans fixiert. Die erhaltenen Daten wurden mittels FlowJo-Software (V8.8.7, Tree Star Inc.) ausgewertet.

5.13 Proteinbiochemische Methoden

5.13.1 Herstellung von Zelllysaten für SDS-PAGE und Western Blot

Die COS-7-Zellen wurden, wie in Kap. 5.12.2 beschrieben, in Suspension gebracht und mit 1 ml PBS in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen für 5 min bei 13.200 rpm pelletiert. Nach Entfernen des gesamten PBS erfolgte die Lyse in Harnstoff-Lysepuffer (Proteinase Inhibitor Mix (1:100), 0,2 M PMSF (1:200)). Hierbei wurde das aus einem konfluenten Well einer 12 Well-Platte geerntete Pellet in ca. 30 µl Harnstoff-Puffer lysiert. Die Lysate wurden für 30 min auf Eis inkubiert und nach Zentrifugation (5 min, 13.200 rpm) in neue 1,5 ml Gefäße überführt. Die Bestimmung der Proteingesamtkonzentration der Zelllysate erfolgte mittels Bradford-Assay (siehe Kap. 5.13.2). Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

5.13.2 Bradford-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur schnellen und einfachen Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford^[151], wird der Proteinlösung im sauren Milieu Coomassie Brilliant-Blau hinzugefügt. Die hierbei entstehenden Farbstoff-Protein-Komplexe bewirken, dass der Farbstoff von dem ungebundenen kationischen roten Zustand in den gebundenen anionischen blauen Zustand überführt wird. Dies führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm (rot) zu 595 nm (blau). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung und kann gegen das freie Farbreagenz photometrisch gemessen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Bradford-Assays mit dem Reagenz Roti-Quant (ROTH) im Mikroansatz (1 - 20 µg Protein) im 96 Well-Format durchgeführt und am Power Wave XS Mikroplatten Spektrophotometer (BioTek) gemessen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die gemessenen Absorptionsmaxima auf eine BSA-Eichgerade bezogen. Diese wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll angesetzt

und bei 4°C gelagert.

Bradford-Ansatz der Eichgeraden:

12,5 µl BSA-Standard
12,5 µl Ameisensäure
225 µl Roti-Quant (1x)

Bardford-Ansatz der Proben:

x µl Harnstoff-Lysat (i.d.R. 1 µl)
x µl dest. Wasser
12,5 µl Ameisensäure
225 µl Roti-Quant (1x)

5.13.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von Proteinen

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen mittels Polyacrylamidgelen bietet den Vorteil, dass die Porengröße in einem für Proteintrennungen wichtigen Bereich variiert werden kann. Dies gelingt über die Wahl unterschiedlicher Monomerkonzentrationen bei der Gelzusammensetzung. Polyacrylamidgele sind chemisch inert womit Wechselwirkungen mit den aufgetragenen Proteinen nahezu ausgeschlossen werden können.

5.13.3.1 Natives Gel

Bei der Elektrophorese in einem nativen Gel bleibt die dreidimensionale Struktur der Proteine, die Tertiärstruktur, erhalten. Dies gelingt über die Wahl geeigneter Puffer. Native Gele eignen sich hervorragend zur Untersuchung der DNA-Bindeeigenschaft von TFs im EMSA. Die Einzelkomponenten wurden sorgfältig durch leichtes schwenken im 15 ml Reaktionsgefäßen gemischt, zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und nach hinzufügen der Gelkämme für mind. 1 h bei Raumtemperatur auspolymerisieren lassen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

5.13.3.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE ist eine denaturierende Gelelektrophorese und dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen gemäß ihres Molekulargewichts. Durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) in Gel und Puffer dissoziieren die Proteinkomplexe in ihre Untereinheiten, was die Bildung von Komplexen zwischen SDS und denaturierten Proteinen begünstigt. Zur Unterstützung des Denaturierungsprozesses wurden die Protein-Proben vor dem Auftragen auf das Geld für 5-10 min bei 95°C in einem SDS-Probenpuffer gekocht. Diese flexible langgestreckte Form begünstigt die Anlagerung des negativ geladenen SDS,

welches mit den Proteinen proportional zur Molekülmasse Komplexe bildet. Somit können die Proteine im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden, wobei kleine Proteine das Gel schneller passieren als größere. Hier wurden ca. 5-10 µg Gesamtprotein in einem Gesamtvolumen von max. 30 µl in zweischichtigen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Im aufpolymerisierten 5%-igen Sammelgel (pH 6,8) wurden die Proteine an der Grenzschicht konzentriert und im anschließenden Trenngel (pH 8,8) separiert. Letzteres wurde zuerst vorbereitet und für eine glatte Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Dieses wurde nach der Polymerisationszeit von mindestens 30 min durch gründliches Spülen mit dest. Wasser wieder entfernt. Die auf der Geloberfläche verbleibende Flüssigkeit wurde mit einem Streifen Whatman-Papier aufgesaugt. Nun wurde das ca. 2 cm lange, die Gelta-schen enthaltende Sammelgel gegossen und ebenso für 30 min auspolymerisieren lassen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Als Größenstandard wurde der PageRuler™ prestained protein ladder (Thermo Scientific) im Gel mitgelaufen. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel entfernt und die Proteine im Western Blot (siehe Kap. 5.13.4) auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Visualisierung der Proteine im SDS-Gel wurde das Trenngel für 1-2 h in einer Coomassie Blau-Färbelösung schüttelnd inkubiert und bis die blauen Proteinbanden sich deutlich im Gel abzeichneten in der Entfärbelösung entfärbt.

5.13.4 Western Blot

Um gezielt einzelne Proteine innerhalb des Gesamtproteins darstellen zu können, wurden die Proteine im Anschluss an die SDS-Gelelektrophorese aus dem Trenngel mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran transferiert. Die PVDF-Membran musste vor Gebrauch in 60%-igem Methanol aktiviert werden. Im Elektroblot wandern die Proteine durch ein senkrecht zum Gel verlaufenden elektrischen Feld aus dem Gel und haften aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an der Membran an. Geblottet wurde ca. 1 h bei maximaler Spannung mit dem Mini-PROTEAN Tetra Cell System von Bio-Rad. Der Blotaufbau entsprach den Anleitungen des Herstellers. Der mitgelaufene Größenstandard PageRuler™ prestained protein ladder (Thermo Scientific) ermöglichte die direkte visuelle Kontrolle des Proteintransfers. Eine Ponceau S-Färbung der PVDF-Membran im Anschluss an den Blot visualisierte die transferierten Proteine, welche gleichzeitig durch die darin enthaltene Trichloressigsäure fixiert wurden. Zusätzlich konnte die Bloteffizienz durch eine

Coomassie Blau-Färbung des SDS-Gels überprüft werden.

5.13.5 Immundetektion der Proteine

Die Darstellung individueller auf die PVDF-Membran geblotteter Proteine erfolgte über eine spezifische Antikörperreaktion. Hierbei wurde entweder das Protein selbst oder ein spezifisches Tag (FLAG, GST) erkannt, weshalb die Methode auch als Immunoblot bezeichnet wird. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS-T und blocken unspezifischer Bindungen mittels TBS-T/6 %-Magermilchpulver, wurden die PVDF-Membranen über Nacht im primären proteinspezifischen Antikörper (AK) inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach mehrmaligem Waschen mit TBS-T die Inkubation mit sekundärem AK in TBS-T/6 %-Magermilchpulver. Dieser war mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (engl.: horseradish peroxidase, HRP) gekoppelt und erkennt den Organismus, aus welchem der primäre AK gewonnen wurde. Die Detektion der Chemielumineszenz erfolgte unter Lichtausschluss mit Hilfe des Covalight Chemiluminescent Reagent Kit von Covalab. Hierzu wurden die Membranen für ca. zwei min in 3 ml des Substrats CovA und 3 Tropfen des Oxidans CovB überschichtet. Während der Inkubation katalysiert HRP unter Anwesenheit von Hydrogenperoxid die Oxidation von Luminol, welches durch die Änderung seiner Konformation eine stabilere Form annimmt, wobei Licht emittiert wird. Dieses chemielumineszente Signal wird bei der anschließenden Filmentwicklung von einem Hyperfilm von Amersham detektiert und in einer speziellen Entwicklerlösung unter stetiger Beobachtung visualisiert und im Anschluss in einer Fixierlösung fixiert. Die Expositionszeit der Filmbelichtung richtete sich nach der Signalstärke.

5.13.6 Entfernen von Antikörpern (Stripping)

Als Stripping wird das Abwaschen der an eine PVDF-Membran gebundenen Antikörper nach erfolgter Immundetektion des Western Blots bezeichnet. Dies war notwendig, wenn weitere Proteine auf der geblotteten PVDF-Membran detektiert werden sollten. Hierzu wurde die PVDF-Membran im Anschluss an die Immundetektion für 20-30 min bei 56°C in Stripping-Puffer inkubiert, 5x für 10 min mit TBS-T gewaschen und für mindestens 1 h in TBS-T/6 %-Magermilchpulver geblockt. Nun wurde die Membran über Nacht bei 4°C im zweiten primären Antikörper schüttelnd inkubiert. Am Folgetag wurde, wie in

Kap. 5.13.5 beschrieben, fortgeföhren.

5.13.7 Proteinexpression in *E. coli*-Stamm BL21-DE3

Um Proteine in möglichst reiner Form und in möglichst großen Mengen zu erhalten, ist es möglich diese im bakteriellen System *in vitro* zu exprimieren und mittels Affinitätschromatographie aufzureinigen. Da viele der *in vitro* exprimierten Proteine für Bakterien toxisch sind, ist eine kontinuierliche Proteinexpression zu unterbinden. Aus diesem Grund steht die Genexpression im bakteriellen Expressionsvektor unter der Kontrolle des *lac*-Operons, welches in *E. coli* durch das Lac-Repressorprotein negativ reguliert wird. Die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) hindert das Lac-Repressorprotein an der DNA-Bindung und induziert die Expression der rekombinanten Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der *E. coli*-Stamm BL21DE3 (New England Biolabs) nach vorangegangener Transformation der TBX3 1-342/pGEX2TK-Expressionsvektoren zur Expression von GST-TBX3 1-342 aa-Fusionsproteinen nach Anleitung des Herstellers verwendet. Zur Überprüfung der Induzierbarkeit der rekombinanten Proteine wurden über Nacht gewachsene Kolonien in 3 ml Antibiotika-haltigem LB-Medium bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Zur späteren Aufreinigung (siehe Kap. 5.13.8) wurde eine 1:100-Verdünnung aus einer Vorkultur in 50 ml Antibiotika-haltigem LB-Medium bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Bei Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) zwischen 0,4-0,8 wurde die Induktion der Proteinexpression durch die Zugabe von 4 μ l IPTG (0,1 M) pro ml Kultur gestartet (t_0). Nach 4 h kontinuierlicher Proteinexpression bei 37°C und 200 rpm wurde diese durch Pelletierung der Bakterien in Harnstoff-Lysepuffer beendet (t_4). Die Lagerung der Pellets erfolgte bei -80°C.

5.13.8 Proteinaufreinigung mittels

GST-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der im vorherigen Kap. beschriebenen, bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteine erfolgte nach Zellyse in Lysepuffer und anschließender Sonifizierung aus klarem Lysat mittels Glutathione Agarose (Cube Biotech) gemäß dem Hersteller-Protokoll (www.cube-biotech/protocols). Die Aufreinigung wurde bei 4°C durchgeführt und gliedert sich in die Schritte Bindung-Waschen-Eluieren. Die verwendeten Puffer wurden

nach Herstellerangaben vor Gebrauch frisch angesetzt. Die Lagerung der aufgereinigten Fusionsproteine erfolgte in 10 %-igem Glycerol bei -20°C . Zur Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte ein Bradford-Assay (siehe Kap. 5.13.2).

5.13.9 Elektromobility Shift Assay (EMSA)

Der EMSA ist eine Methode zur Studie der Genregulation durch Untersuchung von Protein:DNA-Interaktionen und ermöglicht die Untersuchung der DNA-Bindeeigenschaft von TFs wie den T-box-Proteinen. Als DNA-Probe wurde Digoxigenin (Dig) markiertes Oligo1090 (AATTTTCACACCTAGGTGTGAAATT) verwendet. Dieses wurde in einer Konzentration von $10\ \mu\text{M}$ in Annealingpuffer für 5 min bei 100°C im Thermoblock aufgeköcht und zum Annealen auf RT abkühlen lassen. Zur Durchführung des EMSA wurden die aufgereinigten GST-Fusionsproteine (siehe Kap. 5.13.8) in EMSA-Puffer für 15 min im Kältebad bei 15°C präinkubiert.

Präinkubation:

5 μl 2x EMSA-Puffer

1 μl 10x BSA

1 μl Poly dI-dc

x μl Protein (0,5 μg)

Nach Zugabe der annealten Oligo1090 (1 μl) erfolgte die Protein:DNA-Bindereaktion während einer weiteren Stunde Inkubation bei 15°C . Die gebildeten Protein:DNA-Komplexe wurden in einem nativen Polyacrylamidgel (6 %) (siehe Kap. 5.13.3) aufgetrennt und anschließend mittels Western Blot (siehe Kap. 5.13.4) auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Fixierung der Protein:DNA-Komplexe auf der Membran folgte ein UV-Crosslinking (Automode, 1200×100 Microjoules). Nun konnte die Dig-markierte DNA mit Hilfe des DIG Luminescent detection Kit von Roche nach Anleitung des Herstellers über einen AP (Alkaline-Phosphatase) gekoppelten α -DIG-Antikörper detektiert und in einer Lichtreaktion sichtbar gemacht werden. Bei erfolgreicher Bindung der Proteine an die Zielsequenz ist im Gel neben der ungebundenen DNA-Probe ein sogenannter Bandshift erkennbar. Dieser basiert auf der Tatsache, dass ungebundene DNA das Polyacrylamidnetz deutlich schneller passieren kann, als Protein:DNA-Komplexe. Die Visualisierung der Banden erfolgte, wie in Kap. 5.13.5 beschrieben.

5.13.10 Pixeldichteanalyse

Nach der Filmentwicklung erfolgte die Analyse der Pixeldichte der detektierten Banden mit dem Programm ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Hierbei wurde die Pixeldichte der FLAG-positiven TBX-Banden, sowie die Tubulin (Tub)-Kontrollbanden unabhängig voneinander bestimmt. Mittels Microsoft Excel wurden die gemessenen Tub-Werte auf den Tub-Minimalwert normiert. Anschließend wurde der TBX-FLAG-Probenwert auf die zugehörigen normierten Tub-Werte normiert.

5.14 Auswertung und statistische Analyse

Soweit nicht anders gekennzeichnet, erfolgte die Auswertung mit Excel (Microsoft Office 2010 bzw. 2013). Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism (Version 5) durchgeführt. Mittels two-tailed Students's-t-Test wurden zwei Gruppen aus unterschiedlichen Gruppen analysiert. Zum Vergleich mehrerer Gruppen wurde der one-way ANOVA-Test mit Bonferroni's Posttest verwendet. Signifikanzen wurden wie folgt bewertet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

Die Beurteilung der Signifikanz für die Verteilung von in der ICGC-Datenbank aufgeführten TBX-Mutationstypen erfolgte durch Kalkulation der Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der aktuellen oder einer extremeren Verteilung der Mutationen innerhalb der verschiedenen TBX3-Domänen. Hierfür wurde ein Urnenmodell verwendet, wo die Anzahl an Mutationen die Anzahl an sog. draws repräsentiert. Da Mutationen ebenso an denselben Positionen auftreten können (drawing with replacement) wurde eine binominale Verteilung des Verhältnis aus der Länge der TBX3-Domäne bezüglich des TBX3-Gesamtproteins als Erwartungswert der Nullhypothese gewählt. Die sich daraus ergebenden p-Werte wurden um mit dem two-tailed T-Test zu korrespondieren verdoppelt. Die Kalkulation erfolgte mit SAS für die Windows Version 9.4 (SAS Institute Inc.).

5.14.1 Normalisierung der Repression auf die Proteinkonzentration

Obwohl die hier getesteten TBX3-Varianten alle vom selben Expressionsvektor exprimiert wurden, unterschieden sich die nach Western Blot-immunodetektierten Proteinkonzentra-

tionen. Diese Abweichung von der uniformen Expression trägt zu den Unterschieden in der Repressoraktivität der TBX3-Varianten bei. Die Repression wurde ausgehend von der FLuc-Aktivität durch Normalisierung der FLuc-Werte auf die Kontrolle (= 100 %) bezogen. Die erhaltenen Werte wurden dann von 100 subtrahiert, woraus sich für die Kontrolle eine Repression von 0 ergab. Entsprechend lag der Wert für die getesteten TBX3-Varianten zwischen 0 und 100. Die Dosis-Abhängigkeitskurve der p21-Repression zwischen TBX3 und TBX3dm waren in der Range zwischen 8,3 und 25 ng nahezu linear, mit einer Änderung von 0,5 % Repression pro ng an transfiziertem Expressionsvektor (siehe Abb. 6.12). Basierend auf den mittels Pixeldichteanalyse (siehe Kap. 5.13.10) gemessenen relativen Proteinmengen der zum FLuc-Assay zugehörigen Western Blots wurde die Repression durch die mutanten Proteine auf das für TBX3 ermittelte Repressionslevel extrapoliert.

5.15 Proteinsequenzen der TBX-Faktoren

Das in Tab. 6.1 gezeigte Alignment der humanen Proteinsequenzen erfolgte mittels Clustal Omega.^[152] Es wurden folgende Sequenzen verwendet (Genname und Ensembl Protein-Nummer):

EOMES	ENST00000449599	TBX6	ENST00000395224
T	ENST00000296946	TBX10	ENST00000335385
TBR1	ENST00000389554	TBX15	ENST00000207157
TBX1	ENST00000332710	TBX18	ENST00000369663
TBX2	ENST00000240328	TBX19	ENST00000367821
TBX3	ENST00000349155	TBX20	ENST00000408931
TBX4	ENST00000240335	TBX21	ENST00000177694
TBX5	ENST00000310346	TBX22	ENST00000373294

6 Ergebnisse

6.1 Herstellung der Vektorkonstrukte

6.1.1 Herstellung von Vektorkonstrukten zur Expression von mutanten TBX2/3-Varianten in Säugerzellen

Um Rückschlüsse auf die Funktionalität von mutierten TBX-Proteinen ziehen zu können, wurde die zu untersuchende Mutation in die codierende DNA-Sequenz von *TBX2* bzw. *TBX3* mittels Mutagenese-PCR (siehe Kap. 5.11.1.3) mit den in Kap. 5.9.1 gelisteten Primern eingeführt. Als Templatevektoren dienten die von A. Legler im Rahmen ihrer Diplomarbeit konstruierten ENTRY-Vektoren TBX2-3xFLAG/pENTR/D-TOPO (TBX2-Mutagenese) sowie TBX3-3xFLAG/pENTR/D-TOPO (TBX3-Mutagenese, siehe Abb. 6.1 A).^[142] Letzterer wurde auf Basis eines *TBX3+2a*-cDNA-Klons (ImaGenes) konstruiert und codiert für die längere Spleißvariante von TBX3.^[24] Aufgrund der vom Hersteller vorhergesagten Erfolgsquote von 80 % wurden jeweils vier Plasmidpräparationen mittels Sequenzierung (siehe Kap. 5.11.13) mit den in Kap. 5.9.3 gelisteten Primern bezüglich der eingefügten Mutation sowie anschließend die gesamte *TBX*-Sequenz eines für die eingefügte Mutation positiven Klons überprüft. Die Kontrolle der beiden ENTRY-Vektoren von A. Legler ergab innerhalb der *TBX2*-cDNA-Sequenz im Vergleich zu (Ensembl: ENST00000240328) eine zusätzliche Mutation an Position T871C und innerhalb der *TBX3*-Sequenz drei weitere Mutationen: A1854G, C1865T und T1984C. Da es sich jeweils um die Proteinfunktion nicht beeinträchtigende, stumme Mutationen handelte, erfolgte keine Korrektur. Somit sind die genannten Mutationen Teil aller im Rahmen dieser Arbeit hergestellten TBX2/3-Konstrukte. Zusätzlich codieren alle *TBX2/3*-Sequenzen entsprechend der von A. Legler klonierten *TBX2/3*-Sequenzen ein C-terminales FLAG-Tag (3xFLAG).

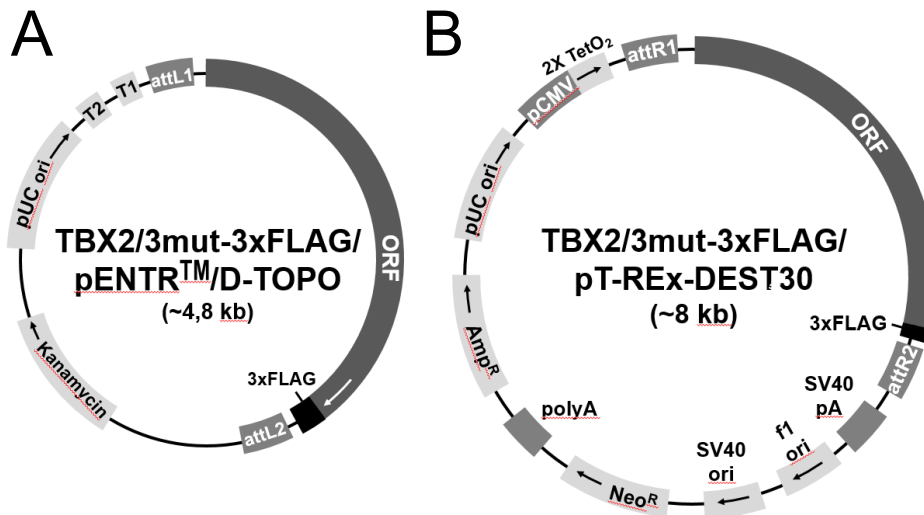


Abbildung 6.1: Vektorkonstrukt zur Mutagenese und zur Expression von TBX2/3-Varianten in Säugerzellen. Dargestellt sind die schematischen Vektorkarten des Entry-Vektors TBX2/3mut-3xFLAG/pENTR™/D-TOPO (A) und des Destinationsvektors TBX2/3mut-3xFLAG/pT-REx-DEST30 (B). Mittels Mutagenese-PCR wurden die TBX2/3-Sequenzen im Entry-Vektor mutiert und anschließend mittels LR-Rekombination in den Destinationsvektor umklont. Alle TBX2/3-Sequenzen codieren ein C-terminales FLAG-Tag (3xFLAG). kb, Kilobase. ORF, open reading frame.

Da der pENTR/D-TOPO-Vektor sich nicht zur Expression in Säugerzellen eignete, wurden die mutierten *TBX2/3*-Sequenzen mittels LR-Rekombination (siehe Kap. 5.11.7) in den Expressionsvektor pT-REx-DEST30 umklont (siehe Abb. 6.1 B).

6.1.2 Herstellung der TBX3 1-342/pGEX2TK-Konstrukte zur bakteriellen Proteinexpression in *E. coli*

Die TBX3-Fragmente wurden mittels Linker-PCR am Template der mutagenisierten TBX3-Konstrukte (siehe Kap. 6.1.1) mit dem Primerpaar 1879/1880 amplifiziert (siehe Kap. 5.9) und in die BamHI/Sall-Schnittstellen des pGEX-2TK-Vektors ligiert (siehe Abb. 6.2 A). Entsprechend leiten sich die TBX3-Fragmente von der längeren Spleißvariante TBX3+2a ab.^[24]

Da alle für die GST-TBX3-Fusionsproteine codierenden Vektorkonstrukte auf diesem Wege hergestellt wurden, ist in Abb. 6.2 B exemplarisch die BamHI/Sall-Restriktionskontrolle des TBX3 1-342aa/pGEX-2TK-Konstrukts (aa, engl.: amino acid) gezeigt. Im Gelbild ist eine dem TBX3 1-342aa-Fragment entsprechende Bande bei 1 kb und eine dem pGEX-2TK-Vektorgerüst entsprechende Bande bei ca. 5 kb erkennbar. Die anschließende Sequenzierung

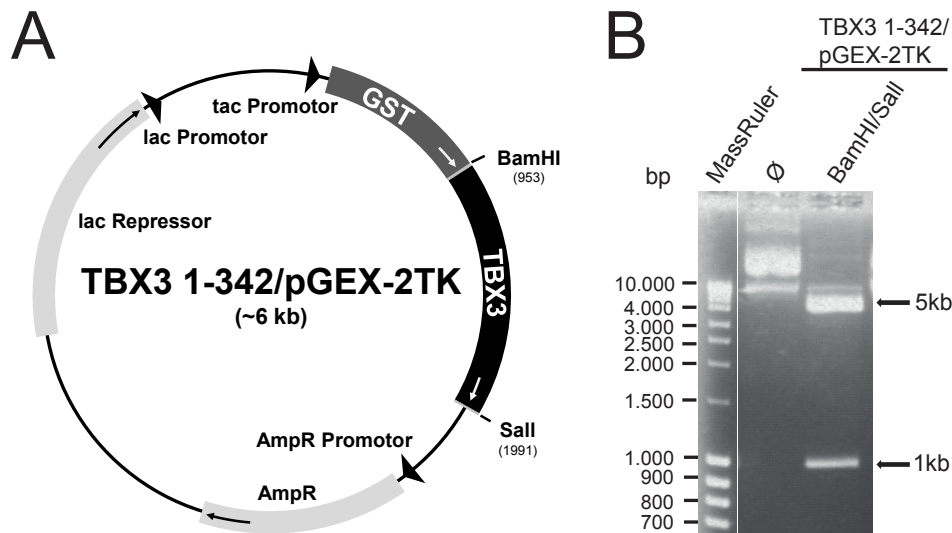


Abbildung 6.2: Generierung von TBX3 1-342/pGEX-2TK zur bakteriellen Proteinexpression in *E. coli*. (A) Dargestellt ist die schematische Vektorkarte von TBX3 1-342/pGEX-2TK zur Proteinexpression in *E. coli*. Das TBX3 1-342aa-Fragment wurde zwischen die BamHI/Sall-Schnittstellen des pGEX-2TK-Vektors ligiert. (B) Das TBX3 1-342/pGEX-2TK-Konstrukt wurde nach BamHI/Sall-Verdau (2 h/37°C) in einem 1%-igen Agarosegel im Vergleich zum unrestrictierten Vektor (Ø) aufgetragen und im Ethidiumbromidbad gefärbt. Die Dokumentation der Banden erfolgte unter UV-Licht. Als Größenstandard wurden 5 µl MassRuler aufgetragen. bp, Basenpaare.

mit den in Kap. 5.9.3 gelisteten Primern zeigte, dass der Vektor zur bakteriellen Expression der GST-TBX3 1-342aa in *E. coli* verwendet werden konnte.

6.1.3 Herstellung des p21-GLuc-Reportergenvektors

Mit dem Ziel einen Gaussia-Luciferase (GLuc)-Vektor unter der Kontrolle des p21-Promotors herzustellen, wurden 2.335 bp der Promotorregion des *p21*-Gens mit den Primern 1322 und 1323 am genomischen Klon (erhalten von G. Spoden, Institut für Mikrobiologie der Universitätsmedizin Mainz) mittels Linker-PCR amplifiziert und in die BglII/HindIII-Schnittstellen des pCMV-GLuc-Zielvektors ligiert (siehe Abb. 6.3 A).

Der BglII/HindIII-Kontrollverdau zur Überprüfung der ligierten Fragmente des p21-GLuc-Konstrukts zeigt eine größere Bande bei ca. 4,9 kb, welche dem GLuc-Vektorgerüst entspricht und eine kleinere dem p21-Promotor entsprechende Bande bei 2,4 kb (siehe Abb. 6.3 B). Da die jeweiligen Fragmentgrößen denen der beiden miteinander ligierten Komponenten entsprach, konnte der p21-GLuc-Vektor im Reportergenassay verwendet werden. Mittels Sequenzierung wurde die Richtigkeit der p21-Sequenz überprüft (siehe Kap. 10.8).

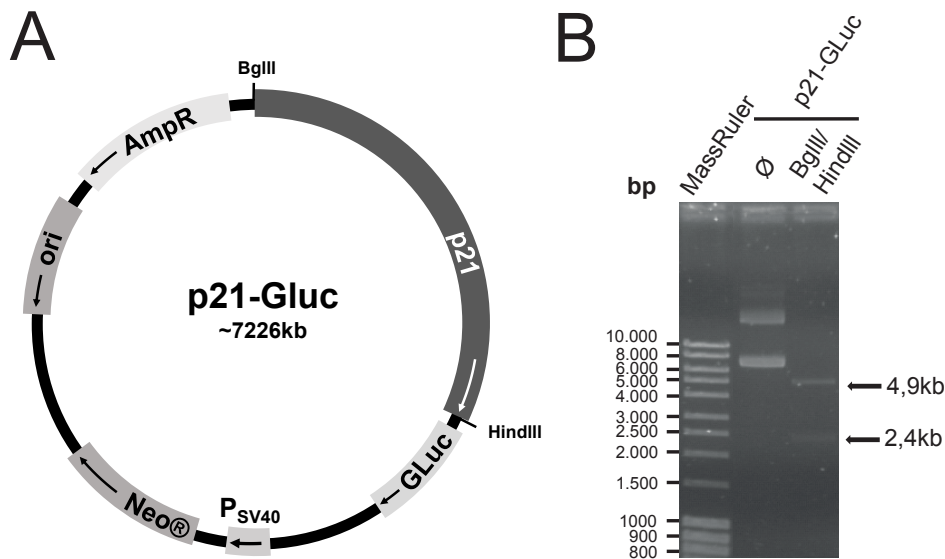


Abbildung 6.3: Generierung des p21-GLuc-Reporterkonstrukts. (A) Dargestellt ist die schematische Vektorkarte des p21-GLuc-Reporterkonstrukts. Das p21-Promotorfragment wurde zwischen die BglIII/HindIII-Schnittstellen des pCMV-GLuc-Vektors ligiert. (B) Das hergestellte p21-GLuc-Konstrukt wurde nach vollständigem BglIII/HindIII-Verdau (2 h/37°C) in einem 1 %-igen Agarosegel im Vergleich zum unrestringierten Vektor (Ø) aufgetragen und im Ethidiumbromidbad gefärbt. Die Dokumentation der Banden erfolgte unter UV-Licht. Als Größenstandard wurden 5 µl MassRuler aufgetragen. bp, Basenpaare. kb, Kilobase. GLuc, Gaussia Luciferase.

6.1.4 Herstellung des p21-FLuc-Reportergenvektors

Mit dem Ziel einen Firefly-Luciferase (FLuc)-Vektor unter der Kontrolle des p21-Promotors herzustellen, wurden 2.335 bp der Promotorregion des *p21*-Gens mit den Primern 1808 und 1323 am genomischen Klon (erhalten von G. Spoden, Institut für Mikrobiologie der Universitätsmedizin Mainz) mittels Linker-PCR amplifiziert und in die KpnI/HindIII-Schnittstellen des Zielvektors pGL3-Control ligiert (siehe Abb. 6.4 A).

Die Richtigkeit des ligierten Vektors wurde mittels KpnI/HindIII-Doppelverdau überprüft. Abb. 6.4 B zeigt, dass nach dem KpnI/HindIII-Kontrollverdau eine größere, dem Vektorgeüst entsprechende Bande bei ca. 5 kb und eine kleinere, dem p21-Promotor entsprechende Bande bei 2,4 kb im Agarosegel auftrat. Das bedeutete, dass die Fragmentgrößen denen der beiden miteinander ligierten Vektorkomponenten entsprachen und der p21-FLuc-Vektor im Reporterassay verwendet werden konnten.

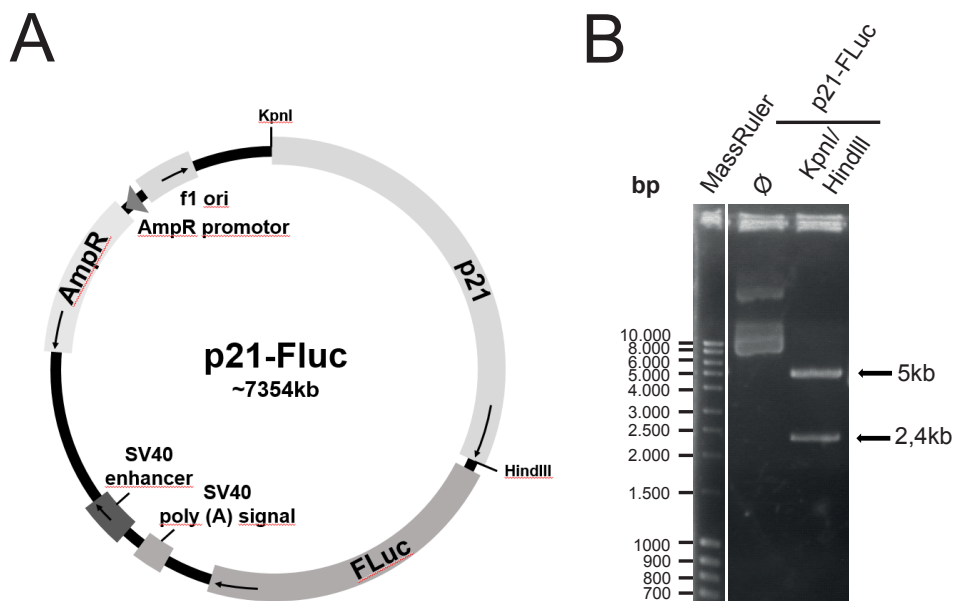


Abbildung 6.4: Generierung des p21-FLuc-Reportergenkonstrukts. (A) Dargestellt ist die schematische Vektorkarte des p21-FLuc-Reportergenkonstrukts. Das p21-Promotorfragment wurde zwischen die KpnI/HindIII-Schnittstellen des pCMV-GLuc-Vektors ligiert. (B) Das p21-GLuc-Konstrukt wurde nach vollständigem KpnI/HindIII-Verdau (2 h/37°C) in einem 1 %-igen Agarosegel im Vergleich zum unrestringierten Vektor (Ø) aufgetragen und im Ethidiumbromidbad gefärbt. Die Dokumentation der Banden erfolgte unter UV-Licht. Als Größenstandard wurden 5 µl MassRuler aufgetragen. bp, Basenpaare. FLuc, Firefly Luciferase.

6.1.5 Herstellung des pTRE3G-TBX2-Expressionsvektors zur Dox-induzierten TBX2-Expression

Zur Generierung eines Expressionsvektors mit Dox-induzierbarer TBX2-Expression war es notwendig, TBX2 unter die Kontrolle des induzierbaren TRE3G-Promotors zu bringen. Der pTRE3G-TBX2 Expressionsvektor (siehe Abb. 6.5 A) wurde mittels der In-Fusion Cloning Methode von Clontech zur gezielten Klonierung von DNA-Fragmenten hergestellt (siehe Kap. 5.11.8). Da das In-Fusion Protokoll eine Linearisierung des Zielvektors vorgibt, wurde als Insertionsstelle für das TBX2-Fragment die Restriktionsschnittstellen Sall (383) und BamHI (447) innerhalb der Multiple Cloning Site (MCS) des pTRE3G-Vektors gewählt. Der Sall/BamHI linearisierte pTRE3G-Vektor wurde mittels eines präparativen Agarosegels aufgereinigt. Die Amplifikation des TBX2-Fragments erfolgte mit dem Primerpaar 1438/1439 (siehe Kap. 5.9) am Template-Plasmid TBX2-3xFLAG/pT-REx-DEST30.^[142] Die Primer enthalten neben der TBX2-Sequenz einen jeweils zu den linearisierten Vektorenden komplementären 15 bp-Überhang. Diese werden vom In-Fusion Enzym erkannt und mit den komplementären Vektorenden fusioniert.

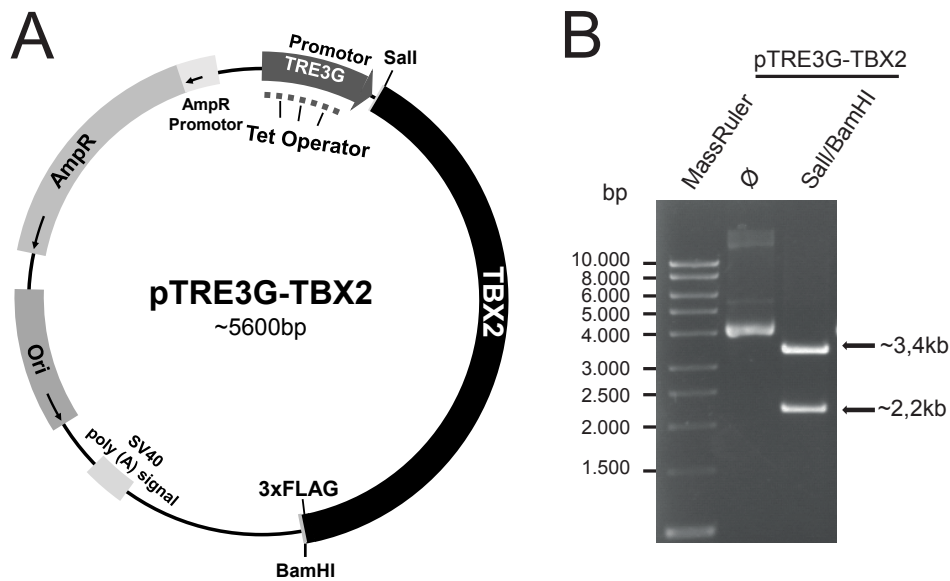


Abbildung 6.5: Generierung des pTRE3G-TBX2-Expressionsvektors zur Dox-induzierten TBX2-Expression. (A) Schematische Vektorkarte von pTRE3G-TBX2-Vektors. Die 3xFLAG-markierte TBX2-Sequenz wurde mittels der In-Fusion-Cloning Methode von Clontech zwischen die Sall/BamHI-Schnittstellen im Bereich der Multiple Cloning Site (MCS) des pTRE3G-Vektors hinter den TRE3G-Promotor ligiert. (B) Das pTRE3G-TBX2-Konstrukt wurde mittels BamHI/Sall vollständig verdaut. 300 ng restringierte DNA wurde im Vergleich zu unrestringiertem Vektor (\emptyset) in einem 1 %-igen Agarosegel überprüft. Als Größenstandard wurden 5 μ l MassRuler aufgetragen. bp, Basenpaare. kb, Kilobase.

Um die Richtigkeit des erhaltenen Vektors zu überprüfen, erfolgte ein BamHI/Sall-Kontrollverdau. Die Gelkontrolle zeigte das erwartete Bandenmuster (siehe Abb. 6.5 B). Das größere Fragment von 3,4 kb entsprach der erwarteten Größe des pTRE3G-Vektorgerüsts nach Verdau mit SaII und BamHI. Das kleinere Fragment entsprach mit ca. 2,2 kb der Größe der *TBX2*-Sequenz. Die Sequenzierung der *TBX2*-Sequenz im pTRE3G-TBX2-Expressionsvektor mit den Primern 1024, 1036, 1066 und 1067 zeigte die ebenso im Template-Vektor von A. Legler gefundene A871C-Mutation (siehe Kap. 6.1.1). Da es sich hier um eine stumme Mutation handelt, wurde der Vektor für die weiteren Versuche verwendet.

6.1.6 Generierung des p21-d2EGFP-Reportergenvektors

Die Herstellung des p21-d2EGFP-Konstrukts (siehe Abb. 6.6 A) erfolgte durch Austausch des PhCMV*-1-Promotors gegen den p21-Promotor im Zielvektor pTRE3G-d2EGFP durch gerichtete Ligation an den Restriktionsschnittstellen XhoI und SacII. Da die p21-Promotorsequenz diese Schnittstellen nicht enthielt, wurden diese bei der Amplifikation

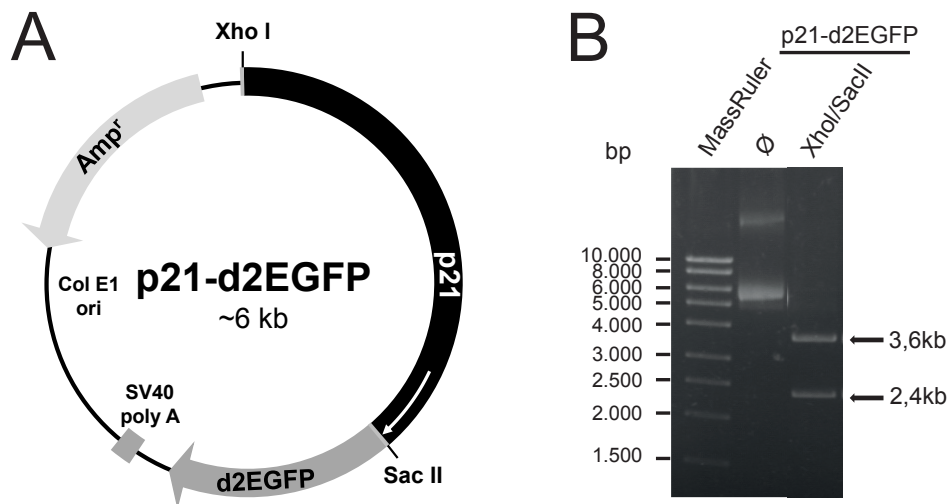


Abbildung 6.6: Generierung des Reportergenvektors p21-d2EGFP. (A) Schematische Vektorkarte des Ligationsvektors p21-d2EGFP. Der p21-Promotor wurde über die Schnittstellen XhoI und SacII in den pTRE3G-d2EGFP-Vektor ligiert und replazierte den PhCMV*-1-Promotor. (B) Gezeigt ist der XhoI/SacII-Doppelverdau des p21-d2EGFP-Vektors im Vergleich zum unbehandelten p21-d2EGFP-Vektor (Ø). Die DNA wurde in einem 0,8 %-igen Agarosegel aufgetrennt und im Ethidiumbromidbad gefärbt. Die Dokumentation der Banden erfolgte unter UV-Licht. Als Größenstandard wurden 5 µl MassRuler aufgetragen. bp, Basenpaare. kb, Kilobase.

durch das Primerpaar 1357/1358 eingeführt. Nach jeweils vollständigem Verdau mit XhoI und SacII wurde das 2,4 kb große p21-PCR-Produkt über PCR-Säulen aufgereinigt und das 3,6 kb große Vektorgerüst aus einem präparativen Agarosegel isoliert. Anschließend erfolgte die Ligation mittels T4 DNA-Ligase.

Mittels XhoI/SacII-Kontrollverdau wurde die Richtigkeit des Ligationsprodukts überprüft. Das nach der Gelelektrophorese erhaltene Bandenmuster (siehe Abb. 6.6 B) zeigte eine Bande bei 3,6 kb, welche der Größe des Vektorgerüsts entsprach, sowie eine Bande bei 2,4 kb, welche der Größe des p21-Fragments entsprach. Durch zusätzliche Sequenzierung des Vektorkonstrukts p21-d2EGFP mit den Primern 960 und 1396 wurde eine fehlerfreie p21-Sequenz bestätigt.

6.2 Analyse potentieller TBX3-Treibermutanten

6.2.1 Aminosäurekonservierung potentieller

TBX3-Treibermutationen

Die Tumorprogression ist ein langsamer, stufenweiser Prozess, der mit zahlreichen, zufallsbasierten Mutationen einhergeht. Positiv selektierte Mutationen erhöhen die relative Fitness der betroffenen Zelle im Vergleich zum umliegenden Gewebe und werden als Treibermutationen bezeichnet.^[48] Da *TBX3* in zwei Brustkrebsgenom-Studien als signifikant mutiertes Gen (SMG)^[77] und Treiber gen^[1] charakterisiert wurde, sollten im Rahmen dieser Arbeit vier der identifizierten potentiellen TBX3-Treibermutationen exemplarisch näher charakterisiert werden (Y163fs2*, H187Y, T210delT und N212delN, siehe Abb. 6.7). Ein wichtiger Parameter zur Beurteilung des Treiberpotentials einer Mutation ist der Konservierungsgrad der mutierten Aminosäure.^[153] Aus diesem Grund wurde zunächst ein T-box-Alignment von TBX3 mit allen paralogen TBX-Faktoren erstellt (siehe Tab. 6.1). Aufgrund des hohen Konservierungsgrades der T-box-Domäne ist dieses Alignment strenger als das von Stephens *et al.*^[1], welche eine volle Konservierung der im Rahmen ihrer Studie identifizierten TBX3-Mutationen bezüglich orthologer Tbx3-Proteine ergab. Das T-box-Alignment zeigt, dass die Mutation T210delT einen voll konservierten Aminosäurerest betrifft. N212delN wurde in drei Brustkrebs-Fällen identifiziert^[1,77] und betrifft einen partiell konservierten Aminosäurerest, nur TBX6 zeigt an dieser Position anstelle des Asparagin ein Serin. In Brachyury (T) und in TBX19 fehlt N212. Von der in zwei Brustkrebs-Fällen identifizierten Mutation H187Y ist ein vollständig konserviertes Histidin betroffen. Zusätzlich zu den Missense-Mutationen beschrieben Stephens *et al.* drei durch Rasterschub verkürzte TBX3-Proteine.^[1] Hier wurde als Beispiel eines verkürzten TBX3-Proteins die

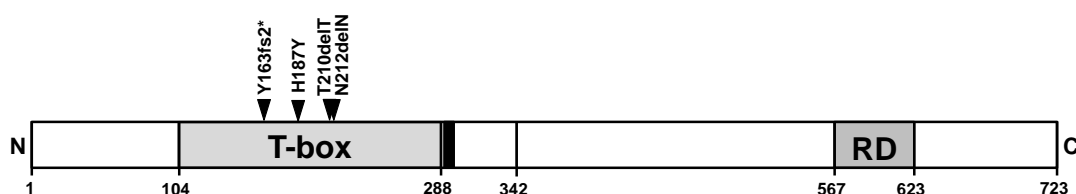


Abbildung 6.7: Lokalisation der zu analysierenden, potentiellen TBX3-Treibermutationen in TBX3. Gezeigt ist die Lage der vier untersuchten, potentiellen Treibermutationen innerhalb der TBX3-Proteinsequenz. Die T-box sowie die dominante Repressordomäne (RD) sind grau hinterlegt. Der schwarze Balken markiert das Kernlokalisierungssignal. N, N-Terminus. C, C-Terminus.

	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2				2	
TBX3	8	8	8	8	8	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1				1
	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5				6		
TBX3	Y	I	H	P	D	S	P	A	T	G	E	Q	W	M	S	K	V	V	T	F	H	K	L	K	L	T	N	N	I	S	D	-	-	-	K		
TBX21	Y	V	H	P	D	S	P	N	T	G	A	H	W	M	R	Q	E	V	S	F	G	K	L	K	L	T	N	N	K	G	A	S	N	N	V		
EOMES	Y	V	H	P	E	S	P	N	T	G	S	H	W	M	R	Q	E	I	S	F	G	K	L	K	L	T	N	N	K	G	A	N	N	N	N		
TBR1	Y	M	H	P	D	S	P	N	T	G	A	H	W	M	R	Q	E	I	S	F	G	K	L	K	L	T	N	N	K	G	A	S	N	N	N		
T	Y	I	H	P	D	S	P	N	F	G	A	H	W	M	K	A	P	V	S	F	S	K	V	K	L	T	N	-	K	L	N	-	-	-	G		
TBX19	Y	I	H	P	D	S	P	N	F	G	A	H	W	M	K	A	P	I	S	F	S	K	V	K	L	T	N	-	K	L	N	-	-	-	G		
TBX4	Y	V	H	P	D	S	P	A	T	G	A	H	W	M	R	Q	L	V	S	F	Q	K	L	K	L	T	N	N	H	L	D	-	-	-	P		
TBX5	Y	V	H	P	D	S	P	A	T	G	A	H	W	M	R	Q	L	V	S	F	Q	K	L	K	L	T	N	N	H	L	D	-	-	-	P		
TBX6	Y	I	H	P	D	S	P	A	T	G	A	H	W	M	R	Q	P	V	S	F	H	R	V	K	L	T	N	S	T	L	D	-	-	-	P		
TBX2	Y	I	H	P	D	S	P	A	T	G	E	Q	W	M	A	K	P	V	A	F	H	K	L	K	L	T	N	N	I	S	D	-	-	-	K		
TBX22	Y	V	H	P	D	S	P	C	S	G	E	T	W	M	R	Q	I	I	S	F	D	R	M	K	L	T	N	N	E	M	D	-	-	-	D		
TBX15	Y	I	H	P	D	S	L	A	S	G	D	T	W	M	R	Q	V	V	S	F	D	K	L	K	L	T	N	N	E	L	D	-	-	-	D		
TBX18	Y	I	H	P	D	S	P	A	S	G	E	T	W	M	R	Q	V	I	S	F	D	K	L	K	L	T	N	N	E	L	D	-	-	-	D		
TBX20	Y	V	H	P	D	S	P	F	T	G	E	Q	L	L	K	Q	M	V	S	F	E	K	V	K	L	T	N	N	E	L	D	-	-	-	Q		
TBX1	H	Y	H	P	D	S	P	A	K	G	A	Q	W	M	K	Q	I	V	S	F	D	K	L	K	L	T	N	N	L	L	D	-	-	-	D		
TBX10	H	F	H	P	D	S	P	A	K	G	A	Q	W	M	R	Q	I	V	S	F	D	K	L	K	L	T	N	N	L	L	D	-	-	-	D		

Tabelle 6.1: Alignment der T-box-Domäne humaner TBX-Proteine mit TBX3. Das gezeigte Alignment umfasst die Positionen 185-216 der T-box-Domäne von TBX3 und beinhaltet die Positionen der potentiellen TBX3-Treiber Mutationen. Die komplette T-box-Domäne von TBX3 umfasst die Aminosäurereste 104 - 288.^[31] In der obersten Spalte wurden die drei hier untersuchten Punktmutationen orange markiert. Voll konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. Positionen mit ähnlichen Aminosäuren sind grün unterlegt.

Deletionsmutante Y163fs2* analysiert.

6.2.2 Herstellung und Isolation der GST-TBX3 1-342aa-Fusionsproteine

Die TBX-Transkriptionsfaktoren (TFs) regulieren die Genexpression durch Bindung der hochkonservierten T-box-Bindedomäne an sog. T-box-Bindeelemente (TBE). Aufgrund der Lokalisation der vier TBX3-Treiber Mutationen (Y163fs2*, H187Y, T210delT und N212delN) innerhalb der T-box (siehe Abb. 6.7) sollte zunächst der Einfluss der jeweiligen Mutation auf die DNA-Bindfähigkeit von TBX3 überprüft werden. Durch die Anfälligkeit des TBX3-Gesamtproteins für Degradierung wurden alle zu untersuchenden TBX3-Varianten als N-terminale Fragmente (1 - 342aa) exprimiert. Die Festlegung der Fragmentlänge erfolgte aufgrund der starken Divergenz zwischen den beiden paralogenen T-box-Proteinen TBX2 und TBX3 ab Position 342. Das TBX3 1-342aa-Fragment enthält nach der T-box-Domäne C-terminal noch ca. 50 zusätzliche Aminosäuren. Alle pGEX-2TK exprimierten TBX3-Fragmente enthielten ein N-Terminales Gluthation S-Transferase (GST)-Tag und wurden als GST-TBX3 1-342-Fusionsproteine bakteriell in *E. coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie (siehe Kap. 5.13.7 und 5.13.8)

aufgereinigt.

Zur Überprüfung des Reinheitsgrads der aufgereinigten GST-TBX3 1-342aa-Fusionsproteine wurden die Proteine im SDS-Gel getrennt und Coomassie gefärbt (siehe Abb. 6.8 A). Die Detektion erfolgte separat mittels GST-Immunoblot (siehe Abb. 6.8 B). Sowohl die Coomassie-Färbung als auch der GST-Immunoblot zeigen, dass die GST-Fusionsproteine von TBX3 sowie der Mutanten H187Y, T210delT und N212delN mittels GST-spezifischem Antikörper entsprechend ihrem Molekulargewicht (64 kDa) bei ca. 70 kDa detektiert wurden. Die aufgrund einer Leserasterverschiebung verkürzte TBX3-Mutante GST-Y163fs2* wurde entsprechend des Molekulargewichts (45 kDa) bei ca. 50 kDa detektiert. Obwohl in allen Spuren die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde, war die Menge an H187Y um etwas mehr als die Hälfte geringer (siehe Abb. 6.8 B und C). Für jedes der Proteine wurde zusätzlich eine im SDS-Gel schnell laufende GST-reaktive Bande bei ca. 30 kDa detektiert. Hierbei handelt es sich um den GST-Teil (26,7 kDa) des Fusionsproteins, welcher offenbar proteolytisch vom N-Terminus seines Fusionspartners abgespalten wird. Zudem sind weitere schwache Banden erkennbar, was auf eine partielle Degradierung hindeutet. Die oberhalb von 70 kDa gelaufene Bande ist nicht GST-reaktiv. Entsprechend den Herstellerangaben handelt es sich hierbei um eine häufig mit aufgereinigte, aus *E. coli* stammende 65-70 kDa

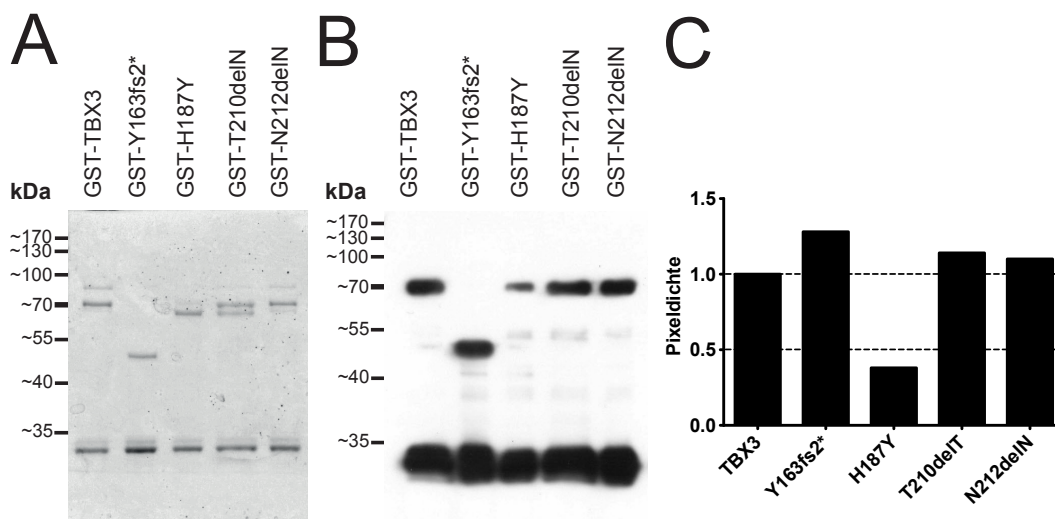


Abbildung 6.8: Expression der GST-TBX3 1-342aa-Fusionsproteine. Nach Transformation in chemisch kompetenten *E. coli* wurden die GST-Fusionsproteine nach IPTG-Zugabe bakteriell exprimiert und mittels Affinitätschromatographie über GST-Säulen aufgereinigt. (A) Die gereinigten GST-TBX3 1-342aa-Fusionsproteine (2 µg) wurden im 10 %-igen SDS-Gel separiert und Coomassie gefärbt. (B) Im Western Blot erfolgte der Nachweis der GST-markierten TBX3-Varianten mittels spezifischem GST-Antikörper. (C) Pixeldichteanalyse der in (B) gezeigten GST-TBX-Proteinbanden. kDa, Kilodalton.

umfassende Kontamination, wobei es sich wahrscheinlich um das Chaperon Dnk handelt. Das Ergebnis zeigt, dass alle Fusionsproteine mit identischem Reinheitsgrad aufgereinigt wurden.

6.2.3 Die DNA-Bindung treibermutanter TBX3-Proteine

Da TBX3 als TF die Genaktivität über die Bindung an TBEs reguliert, sollte der Einfluss der in der T-box-Domäne lokalisierten Treibermutationen auf die DNA-Bindung der TBX3-Proteine *in vitro* überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde wildtypisches sowie mutantes GST-Fusionsprotein im Elektro Mobility Shift Assay (EMSA) auf das Bindungsverhalten bezüglich der Brachyury Consensus-Sequenz überprüft.^[154]

Abb. 6.9 zeigt für das wildtypische TBX3-Protein einen starken Shift (Pfeilkopf). Im Vergleich hierzu war die Bindung von TBX3 durch die Mutation N212delN leicht und durch die Mutation T210delT etwas stärker vermindert. Die Bindung von H187Y konnte nur nach Überexposition des Films gezeigt werden (siehe Abb. 6.9 B). Für die Frameshift-Mutante Y163fs2* konnte keine DNA-Bindung nachgewiesen werden.

Das Ergebnis des EMSAs deutet darauf hin, dass die getesteten Treibermutanten in ihrer DNA-Bindefähigkeit eingeschränkt waren.

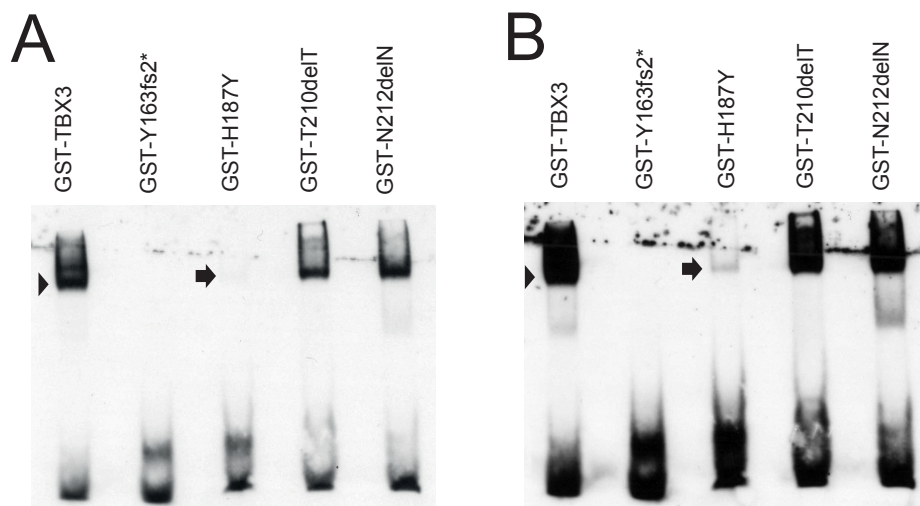


Abbildung 6.9: DNA-Bindung aufgereinigter GST-TBX3-Fusionsproteine im EMSA. Im EMSA wurden je 0,5 µg der aufgereinigten GST-TBX3 1-342aa-Fusionsproteine auf ihre DNA-Bindung bezüglich 10 µg/µl Dig-markierter Brachyury Consensus-Sequenz (Oligo1090) getestet. Die DNA-Proteinkomplexe wurden im 6 %-igen nativen Polyacrylamidgel getrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mittels AP-Immunoblot detektiert. Gezeigt ist ein EMSA nach normaler Expositionszeit (5 min, A) sowie nach Überexposition (ca. 11 min, B).

6.2.4 Einfluss treibermutanter TBX3-Proteine auf die p21-Regulation im Reportergentest (p21-GLuc/FLuc)

Bei der Unterdrückung der zellulären Seneszenz durch TBX2/3 spielt die transkriptionelle Repression der Cyclin-Kinaseinhibitoren 1A (p21) und 2A (human: p14ARF; murin: p19ARF) eine Schlüsselrolle. Da die Repression durch TBX2/3 über direkte Bindung an den Promotor erfolgt, kann die Aktivität von TBX2/3-Varianten direkt über ein p21-Promotor kontrolliertes Reportergen im Reportergenassay überprüft werden.^[36,155] Daher wurde der Einfluss der potentiellen Treibermutanten auf die p21-Promotoraktivität im transienten GLuc-Reportergenassay überprüft. Als Normierung diente der für die FLuc codierende pGL3-Control-Vektor.

Da die potentiellen Treibermutanten einen Einfluss auf die DNA-Bindung hatten (siehe Abb. 6.9), wurde als zusätzliche Kontrolle der Einfluss der DNA-Bindemutanten TBX3dm (G129A/R130S) auf die p21-GLuc-Aktivität überprüft. TBX3dm wurde auf Basis der Arbeit von Sinha *et al.*^[30] konstruiert, welche zeigten, dass die Mutation des hochkonservierten Arginins (R) an Position 122 zu Alanin (A, R122A) die DNA-Bindung von TBX2 aufhebt, ohne dabei weder die Proteinstabilität noch die nukleäre Lokalisation von TBX2 zu beeinträchtigen. Punktmutationen an äquivalenten Positionen heben ebenso die DNA-Bindung anderer T-box-Proteine auf (TBX5: G80R^[156], Omb: R355K^[157]).

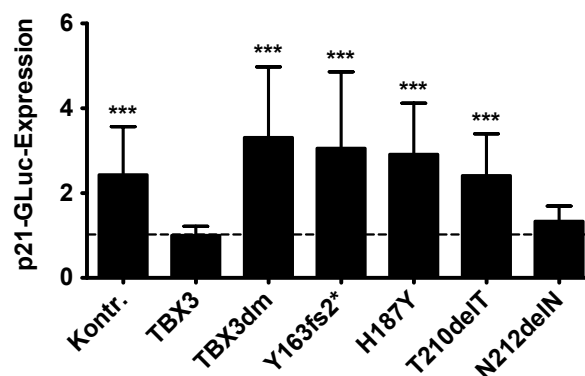


Abbildung 6.10: Modulation des p21-Promotors durch die potentiellen treibermutanten TBX3-Proteine (p21-GLuc/FLuc). COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden mit den Reporterkonstrukten p21-GLuc und pGL3-Control (FLuc) ($0,5 \mu\text{g/ml}$; $10:1$) sowie den für die gezeigten TBX-Varianten codierenden Konstrukten bzw. dem Leervektor pT-REx/GW-30/lacZ (Kontr.) ($0,5 \mu\text{g/ml}$) mittels FuGENE HD ($3 \mu\text{l/ml}$) cotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die FLuc-normierten GLuc-Werte wurden auf TBX3 normiert. Gezeigt ist der Mittelwert ($n=8$) plus SD. Signifikante Unterschiede wurden mit one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest relativ zu TBX3 berechnet.

Der normierte GLuc-Assay (siehe Abb. 6.10) zeigt sowohl für normales TBX3 als auch für N212delN eine im Vergleich zur Kontrolle (Kontr.) signifikante Repression des p21-Promotors, wobei N212delN im Vergleich zum normalen TBX3 ein etwas schwächerer Repressor war. Die drei anderen treibermutanten TBX3-Proteine (Y163fs2*, H187Y und T210delT) sowie die DNA-Bindemutante TBX3dm konnten im Vergleich zur Kontrolle den p21-Promotor nicht reprimieren. Im Vergleich der Einzelexperimente zeigten die normierten GLuc-Reporterassays starke Varianzen in der p21-Modulation durch die in ihrer Repressionsstärke eingeschränkten Mutanten, welcher sich in der hohen Standardabweichung widerspiegelte. Da die Aktivität der Luciferasen (GLuc/FLuc) unabhängig voneinander gemessen wurde, konnten technische Probleme nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Daher sollte auf das Dual-Luciferase Reporter Assay System von Promega umgestiegen werden. Dieses bietet den Vorteil, dass die FLuc-Aktivität sowie die Renilla (RLuc)-Aktivität direkt nacheinander in demselben Lysat gemessen werden.

6.2.5 Einfluss treibermutanter TBX3-Proteine auf die p21-Regulation im Dual-Reportergentest (p21-FLuc/RLuc)

Die Überprüfung der durch die TBX3-Treibermutanten vermittelten p21-Regulation mittels dem Dual-Luciferase Reporter Assay System von Promega ergaben, nach der Normierung der p21-FLuc- auf die RLuc-Aktivität, nur minimale Unterschiede in der p21-Regulation durch die getesteten TBX3-Varianten (siehe Abb. 6.11 A).

Da bereits für andere Normalisierungsstrukturen eine Modulation durch TBX2 und TBX3 beschrieben ist^[158], wurden die FLuc- und die RLuc-Aktivität getrennt analysiert. Wie in Abb. 6.11 B und C gezeigt, hatten alle getesteten TBX3-Varianten einen vergleichbaren Einfluss sowohl auf die FLuc- als auch auf die RLuc-Aktivität. So waren das normale TBX3 und die N212delN-Mutante im Vergleich zur Kontrolle sowohl starke Repressoren des p21- sowie des Thymidin Kinase (TK)-Promotors. Die Repressionsstärke der Mutanten Y163fs2*, H187Y, T210delT und TBX3dm entsprachen nicht dem Wildtyp.

Dieses Ergebnis zeigt, dass TBX3 und seine Varianten potente Modulatoren des RLuc-regulierenden TK-Promotors sind. Folglich ist der pGL4.74 als Normierungskontrolle ungeeignet.

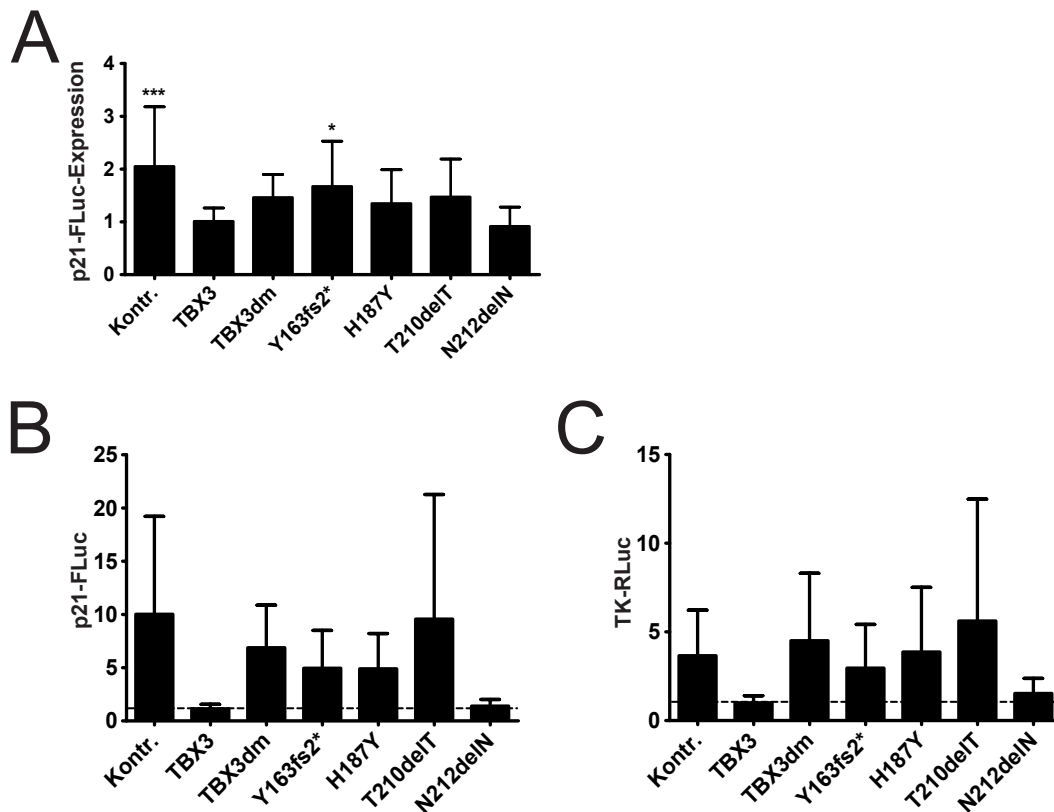


Abbildung 6.11: Modulation des p21- sowie des TK-Promotors durch die potentiell treiber-mutanten TBX3-Proteine (p21-FLuc/RLuc). COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden mit den Reporterkonstrukten p21-FLuc und pGL4.74 (RLuc, 0,25 μ g/ml; 10:1) sowie den für die gezeigten TBX-Varianten codierenden Konstrukte bzw. dem Leervektor pT-REx/GW-30/lacZ (Kontr., 0,25 μ g/ml) mittels FuGENE HD (3 μ l/ml) cotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität mittels dem Dual-Luciferase-Reporterassay-System von Promega gemessen. Gezeigt sind die auf TBX3 normierten Werte ($n=7$) des RLuc-normierten p21-FLuc-Assays (A) sowie die Einzeldaten der FLuc-Aktivität (B) und der RLuc-Aktivität (C) plus SD. Signifikante Unterschiede wurden mit one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest relativ zu TBX3 berechnet.

6.2.6 Reporter-gen-Repression in transfizierten Zellen: Die Rolle der DNA-Bindung

Da aufgrund der Expressionsregulation des *RLuc*-Normalisierungsgens im verwendeten pGL4.74-Vektor durch die getesteten TBX3-Varianten auf eine konventionelle Normalisierung verzichtet werden musste (siehe Abb. 6.11), sollte nun die Abhängigkeit der p21-Repression von der Proteinkonzentration überprüft werden.

Hierbei zeigte sich eine Dosisabhängigkeit der Repression des p21-FLuc-Konstrukts durch TBX3 in COS-7-Zellen (siehe Abb. 6.12). Die p21-Repression des normalen TBX3 lag bei der höchsten getesteten Vektorkonzentration (25 ng) bei 80-90% und die von TBX3dm bei 60%. Die Transfektionseffizienz war bei der gewählten Transfektionsbedingung am höchsten

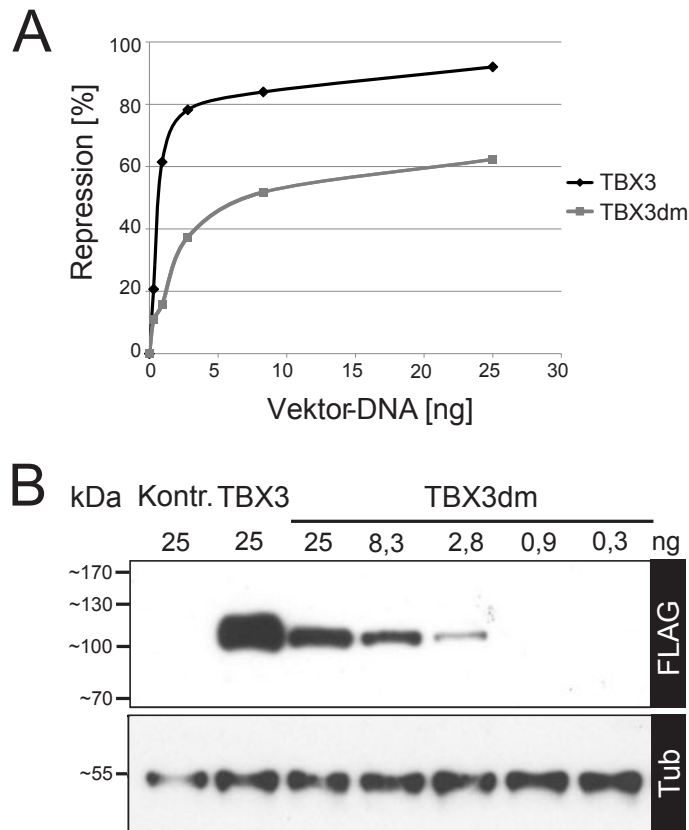


Abbildung 6.12: Repression des p21-FLuc-Reporters durch TBX3 und die DNA-Bindemutante TBX3dm. COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden mit dem Reporterkonstrukt p21-FLuc ($0,25 \mu\text{g/ml}$) sowie den gezeigten Konzentrationen des TBX3 bzw. TBX3dm codierenden Konstrukts bzw. dem Leervektor pT-REx/GW-30/lacZ (Kontr.) mittels FuGENE HD ($3 \mu\text{l/ml}$) cotransfiziert. Die TBX-Gesamtkonzentration von $0,25 \mu\text{g/ml}$ wurde entsprechend mit dem Leervektor pT-REx/GW-30/lacZ (Kontr.) aufgefüllt. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität gemessen. (A) Zur Erstellung der Dosis-Abhängigkeitskurve wurde die Luciferase-Repression in Abwesenheit von TBX3 als Null definiert und die RLU-Werte einer TBX3- bzw. TBX3dm-Verdünnungsreihe in Relation dazu aufgetragen. (B) Die TBX3dm-Expression der Verdünnungsreihe wurde im Vergleich zu TBX3 im Western Blot mittels FLAG-Immunodetektion visualisiert. Die Kontrolle des Gesamtproteins erfolgte mittels anti-alpha-Tubulin (Tub). kDa, Kilodalton.

(siehe Abb. 6.32). Die TBX3-Kurve erreichte bereits bei 1 ng eine 60 %-ige Repression (siehe Abb. 6.12 A). Dieser Grad an Repression wurde bei TBX3dm erst bei 25 ng erreicht. Dies deutet auf eine partielle Unabhängigkeit der TBX3-vermittelten p21-Repression von der DNA-Bindung hin. In transfizierten COS-7 war die Proteinmenge von TBX3dm um das 2-fache niedriger als die im Western Blot FLAG-detektierte TBX3-Proteinmenge (siehe Abb. 6.12 B). Daher sollte die Repression von TBX3dm bei 25 ng mit der von TBX3 bei 12,5 ng verglichen werden (siehe Abb. 6.12 A). Aufgrund der schwachen Steigung in diesem Bereich der Dosis-Abhängigkeitskurve bleibt TBX3 im Vergleich zu TBX3dm auch nach Anpassung an die unterschiedliche Proteinkonzentration der bessere Repressor.

6.2.7 Repression des Reportergens in transfizierten Zellen: Der Effekt potentieller TBX3-Treiber Mutationen

Nun sollte der Einfluss der potentiellen Treiber Mutationen auf die TBX3-Aktivität im FLuc-Reporterassay überprüft werden. Aufgrund der Expressionsregulation des *RLuc*-Normalisierungsgens durch die TBX3-Varianten (siehe Abb. 6.11) wurde auf eine Normalisierung verzichtet.

Wie in Abb. 6.13 A gezeigt, reprimierte TBX3dm die p21-FLuc-Aktivität um das 1,5- bis 2-fache. Die Repressionsstärken der schwachen DNA-Bindemutanten H187Y und T210delT unterschieden sich nicht signifikant von TBX3dm. Dagegen war Y163fs2* in allen Experimenten ein schwächerer p21-FLuc-Repressor als TBX3dm. Die p21-FLuc-Repression von N212delN war nicht signifikant schwächer als die des wildtypischen TBX3-Proteins. Während die Unterschiede der p21-FLuc-Repression zwischen TBX3dm, Y163fs2*, H187Y und T210delT gering und bezogen auf TBX3dm nicht signifikant waren, wurde diese relative Ordnung in allen durchgeführten Experiment gefunden.

Da sich das Expressionsniveau von TBX3dm charakteristisch von dem des wildtypischen TBX3-Proteins unterschied (siehe Abb. 6.12 A), wurde das Protein-Expressionslevel der im Luciferase-Reporterassay bezüglich ihrer p21-Aktivität getesteten TBX3-Varianten ebenso mittels Western Blot über FLAG-Immunodetektion nachgewiesen. Die Kontrolle der Proteinexpression sowie die zugehörige Pixeldichteanalyse (siehe Abb. 6.13 B und D) zeigte, dass sich die Konzentrationen der getesteten TBX3-Varianten auf charakteristische Weise von der Expression des wildtypischen TBX3-Proteins unterschieden. Während die Expression von TBX3dm ca. um das 2-fache, die von H187Y ca. um das 3-fache und die von T210delT um ca. das 1,5-fache geringer war, war die N212delN-Expression um ca. das 1,5-fache höher. Da dem verkürzten Protein der Frameshift-Mutante Y163fs2* das C-terminale FLAG-Tag fehlte, war diese nicht detektierbar.

Die Normalisierung der p21-FLuc-Werte auf ein einheitliches Proteinlevel ermöglichte nur einen Näherungswert. Im Bereich zwischen 8,3 ng und 25 ng war die Konzentrationsabhängigkeit der p21-FLuc-Repression annähernd linear mit einem Repressionsunterschied von 0,5 % pro transfiziertem Nanogramm Expressionsvektor. Mittels den beobachteten relativen Proteinkonzentrationen wurde die Repression auf das TBX3-Proteinlevel extrapoliert. Diese Korrektur führte zu einer stärkeren Repression der im Vergleich zu TBX3 geringer

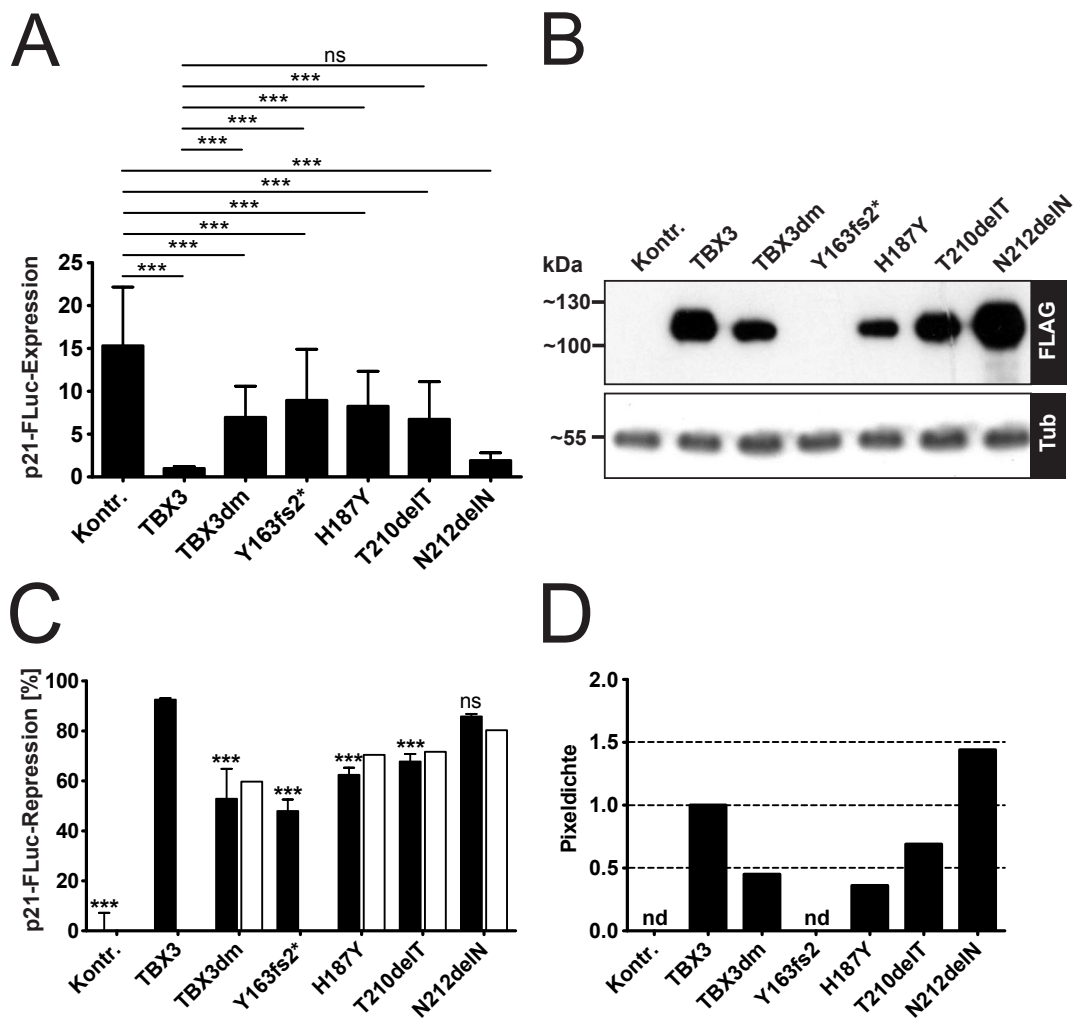


Abbildung 6.13: Repression des p21-FLuc-Reporters durch TBX3 und die getesteten treibermutanten TBX3-Proteine. COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden mit dem Reporterkonstrukt p21-FLuc (0,25 μ g/ml) sowie den für die gezeigten TBX-Varianten codierenden Konstrukte bzw. dem Leervektor pT-REx/GW-30/lacZ (Kontr.) (jeweils 0,25 μ g/ml) mittels FuGENE HD (3 μ l/ml) cotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die FLuc-Aktivität gemessen. (A) Die RLU-Werte des Reporterassays wurden auf TBX3 normiert. Gezeigt ist der Mittelwert ($n=6$) plus SD. (B) Die Proteinexpression von Zellextrakten wurde im Western Blot mittels FLAG-Immuno-detektion visualisiert. Die Menge an Gesamtprotein wurde mit anti-alpha-Tubulin (Tub) kontrolliert. (C) Die p21-FLuc-Aktivität wurde mit den ermittelten Proteindaten korreliert. Um die Repressionsdaten zu erhalten, wurden diese Werte von 100 subtrahiert, dabei erhielt die Kontrolle 0%-Reprimierung. Die schwarzen Balken zeigen den Mittelwert plus SD. Die weißen Balken stellen die Werte nach der Normierung auf die unterschiedlichen Proteinkonzentrationen dar (siehe Kap. 5.14.1). (D) Pixeldichteanalyse des in (B) gezeigten Western Blots. Die Tub-normierten FLAG-Werte wurden auf TBX3 normiert. Signifikante Unterschiede wurden mit einem one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest zu TBX3 (A, C) berechnet und zur Kontr. (A) kDa, Kilodalton. nd, nicht detektiert. ns, nicht signifikant.

exprimierten Proteine, und umgekehrt. Dennoch war der Effekt der Normalisierung gering (siehe Abb. 6.13 C). Die Normalisierung konnte aus oben genannten Gründen nicht für die FLAG-freie Variante Y163fs2* durchgeführt werden.

6.2.8 Die Repression der endogenen *p21*-Expression durch TBX3 und seiner Treibermutanten

Transient transfizierte Reporterengenkonstrukte können die regulatorische Komplexität der endogenen Genexpression nicht exakt wiedergeben. Daher wurde der Einfluss der verschiedenen TBX3-Treibermutanten auf die endogene *p21*-Transkription mittels qPCR untersucht.

Das Ergebnis zeigte, dass TBX3 auch die endogene *p21*-Expression reprimierte (siehe Abb. 6.14, schwarze Balken). Die Repression war jedoch im Vergleich zur Repression des *p21*-FLuc-Reporterengenkonstrukts (siehe Abb. 6.13 A) gering. Die DNA-Bindemutante TBX3dm konnte die endogene *p21*-Expression nicht reprimieren. Die durch die potentiellen Treibermutanten H187Y, T210delT und N212delN vermittelte endogene *p21*-Expression war vergleichbar mit der von TBX3. Daran änderte auch die Normierung der *p21*-Expressionsrate

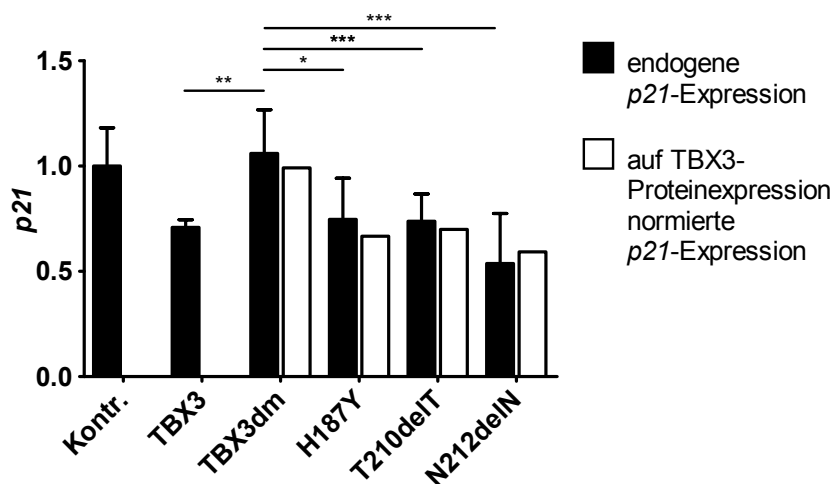


Abbildung 6.14: Die Repression der endogenen *p21*-Expression durch die TBX3-Treibermutanten. COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden mit den für die gezeigten TBX-Varianten codierenden Expressionskonstrukte bzw. dem Leervektor pT-REx/GW-30/lacZ (Kontr., jeweils 0,5 μ g/ml) mittels FuGENE HD (3 μ l/ml) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die RNA extrahiert. Die Analyse der endogenen *p21*-Expression erfolgte mittels qPCR. Die schwarzen Balken zeigen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten gemessen in Triplikaten plus SD. Zur Korrektur der Unterschiedlichen Proteinexpression wurden die Werte wie in Kap. 5.14.1 beschrieben angeglichen. Signifikante Unterschiede wurden mit one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest relativ zu TBX3 und TBX3dm berechnet. kDa, Kilodalton.

auf die Proteinmenge nichts (siehe Abb. 6.14, weiße Balken), welche wie in Kap. 5.14.1 beschrieben durchgeführt wurde. Zur Repressionsstärke der Frameshift-Mutante Y163fs2* ist hier keine Aussage möglich, da diese nicht getestet wurde.

Dieses Ergebnis zeigte, dass sich die Repressionsstärke der TBX3-Derivate bezüglich der endogenen *p21*-Expression sowie des transfizierten p21-FLuc-Reporters unterschieden. TBX3-Mutanten mit eingeschränkter DNA-Bindung (H187Y, T2120delT und N212delN, siehe Kap. 6.2.3) konnten im Gegensatz zu der DNA-Bindemutante TBX3dm das endogene *p21*-Gen effektiv reprimieren. Dagegen reprimierte TBX3dm die vom p21-Promotor regulierte Reportergenexpression um 40 - 50 % und zeigte eine zu H187Y und T210delT vergleichbare Repression.

6.2.9 Differentielle Expression der mutanten TBX3-Proteine

Das mittels Western Blot detektierte Expressionslevel der getesteten TBX3-Varianten unterschied sich charakteristisch voneinander (siehe Abb. 6.13 B). Da die Expression aller TBX3-Varianten im gleichen Expressionsvektor erfolgte (pT-REx-DEST30), könnten die unterschiedlichen Proteinmengen auf Unterschieden in der Proteinstabilität basieren. Um dies zu überprüfen, wurde die Proteinstabilität exemplarisch für die Proteine TBX3, H187Y und N212delN getestet.

Dazu erfolgte nach transients Transfektion die Blockade der Proteinexpression durch Cycloheximid (CHX), wie in Griffin *et al.*^[150] beschrieben. Die Stabilität wurde über einen Zeitraum von 24 h getestet und die Proteinexpression wurde auf Tubulin normiert, welches über diesen Zeitraum stabil schien. Die normalisierte TBX3-Proteinmenge reduzierte sich innerhalb von 12 h auf einen Wert von 0,73, wogegen die H187Y-Menge auf 0,2 sank (siehe Abb. 6.15 A und C). Das Ergebnis zeigt, dass H187Y einem ca. dreifach schnelleren Abbau als TBX3 unterlag. Die Proteinmenge von N212delN war etwas höher als TBX3, aber ähnlich stabil (siehe Abb. 6.15 B und C). Die Proteinstabilität lieferte daher keine Erklärung für die im Western Blot mittels FLAG-Immunodetektion ermittelten höheren N212delN-Mengen.

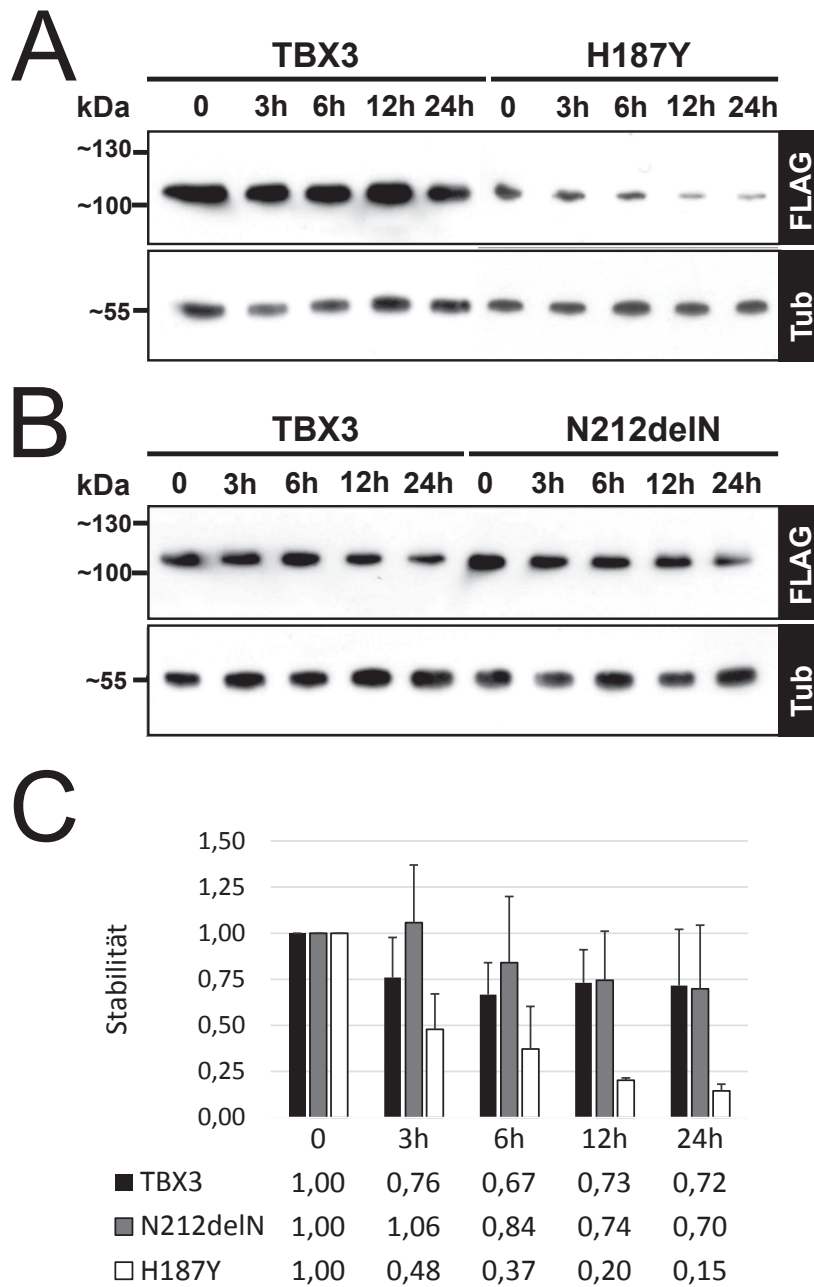


Abbildung 6.15: Stabilität der mutanten TBX3-Proteine H187Y und N212delN im Vergleich zu TBX3. COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden mit den für die gezeigten TBX-Mutanten codierenden Expressionskonstrukten ($0,5 \mu\text{g/ml}$) mittels FuGENE HD ($3 \mu\text{l/ml}$) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde Cycloheximid (CHX, $25 \mu\text{g/ml}$) hinzugefügt und die Zellen nach den gezeigten Inkubationszeiten lysiert. Die Proteinexpression aus Zelllysaten wurde im Western Blot mittels FLAG-Immunodetektion quantifiziert. Die Kontrolle des Gesamtproteins erfolgte mittels anti-alpha-Tubulin (Tub). Gezeigt ist der Vergleich der Proteinestabilität zwischen TBX3 und H187Y (A) bzw. N212delN (B). (C) Gezeigt ist die Pixeldichteanalyse für das Proteinlevel von TBX3 ($n=6$), H187Y 8 ($n=3$) und N212delN ($n=3$) normiert auf den für das jeweilige Protein ermittelten, uninduzierten Kontrollwert (0). kDa, Kilodalton.

6.2.10 Von *TBX3*/pT-REx-DEST30-Expressionsvektoren regulierte *TBX3*-Expression

Da die Proteinstabilität nicht die Ursache für die im Vergleich zu *TBX3* höhere N212delN-Konzentration war, sollte nun die *TBX3*-Genexpression transient transfizierter COS-7 Zellen mittels qPCR untersucht werden. Hierbei zeigte sich für H187Y im Vergleich zu *TBX3* eine geringere Menge an Transkript und für N212delN eine signifikant höhere Menge (siehe Abb. 6.16). Die Überprüfung der endogenen *TBX3*-Expression lässt vermuten, dass die Unterschiede im Proteinlevel auf Unterschieden der RNA-Produktion bzw. im RNA-Turn-over basieren.

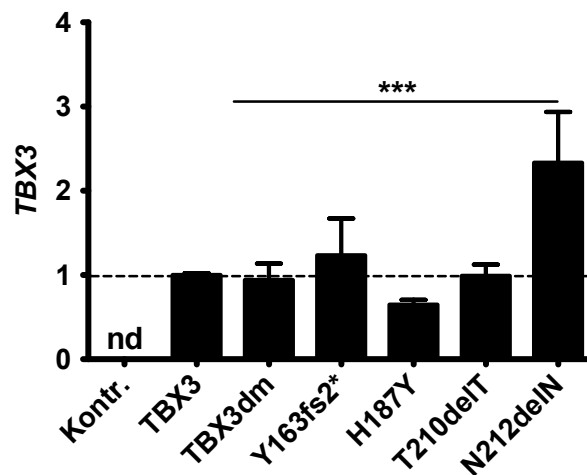


Abbildung 6.16: Die von den *TBX3*/pT-REx-DEST30-Expressionsvektoren regulierte *TBX3*-Expression. COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden mit jeweils $0,5 \mu\text{g/ml}$ der für die gezeigten *TBX3*-Varianten codierenden Expressionskonstrukte bzw. dem Leervektor pT-REx/GW-30/lacZ (Kontr.) mittels FuGENE HD ($3 \mu\text{l/ml}$) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die RNA extrahiert. Die Analyse der endogenen *TBX3*-Expression erfolgte mittels qPCR. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten gemessen in Triplikaten plus SD. Signifikante Unterschiede wurden mit one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest relativ zu *TBX3* berechnet. kDa, Kilodalton. nd, nicht detektiert.

6.2.11 Statistische Analyse somatischer *TBX3*-Mutationen in humanen Krebsgeweben

Die somatische Mutationen umfassende Datenbank des Internationalen Cancer Genome Consortiums (ICGC, <https://dcc.icgc.org>, release 17) listet 149 somatische Mutationen im *TBX3*-Gen. Um Rückschlüsse bezüglich der kanzerogenen Relevanz dieser Mutationen ziehen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit Mutationen der anderen humanen *TBX3*-

	EOM ES	T	TBR 1	TBX 1	TBX 2	TBX 3	TBX 4	TBX 5	TBX 6	TBX 10	TBX 15	TBX 18	TBX 19	TBX 20	TBX 21	TBX 22	average	total
Liver Cancer - RIKEN, JP	8,6	9,2	10,5	0	5,9	7,2	9,9	13,3	2,4	5,2	17,1	16	16	22,8	11,7	14,7	10,66	396
Esophageal Adenocarcinoma - UK	6,5	9,2	9,5	9,7	1	3,9	10,5	16,4	1,2	2,1	16,1	14	10,7	16,3	9,6	0	8,54	335
Pancreatic Cancer - AU	12,9	8,4	9,5	11,8	7,8	11,1	11,7	13,1	6	0	0	5,9	9,3	12,6	12,8	12,3	9,08	255
Skin Cutaneous melanoma - TCGA, US	12,9	10,7	14,3	6,5	7,8	5,9	7	3,8	13,3	18,8	8,9	4,8	10	8,5	8,5	6,7	9,28	239
Ovarian Cancer - AU	4,3	4,6	1	12,9	2,9	6,5	6,4	8,7	3,6	8,3	12,9	9,4	5,3	6,8	3,2	8,6	6,59	235
Gastric Adenocarcinoma - TCGA, US	7,5	11,5	11,4	5,4	9,8	5,2	4,7	4,9	19,3	10,4	0,7	4,4	6,7	1	6,4	4,9	7,14	160
Liver Cancer - FR	1,1	1,5	1,9	2,2	2,9	0,7	4,7	2,3	7,2	3,1	5,1	14,7	5,3	0,7	6,4	2,5	3,89	146
Liver Adenocarcinoma - TCGA, US	8,6	7,6	7,6	6,5	5,9	5,2	7	3,3	13,3	7,3	2,6	3,1	3,3	3,1	4,3	3,1	5,74	137
Liver Cancer - NCC, JP	7,5	2,3	6,7	9,7	3,9	2,6	4,1	5,6	3,6	2,1	2,3	3,1	4,7	4,1	5,3	4,9	4,53	124
Renal Cell Cancer - EU/FR	1,1	1,5	2,9	5,4	8,8	1,3	8,8	4,1	1,2	2,1	4,4	5,9	3,3	3,4	5,3	1,2	3,79	124
Lung Squamous Cell Carcinoma - TCGA, US	4,3	6,9	4,8	0	5,9	7,8	0,6	2,3	2,4	4,2	0,5	3,5	3,3	2,7	5,3	8	3,91	101
Pancreatic Cancer - CA	3,2	3,1	1,9	3,2	3,9	3,9	1,8	4,1	1,2	1	4	1,8	9,3	2	4,3	1,8	3,16	95
Breast Cancer - TCGA, US	3,2	3,1	3,8	2,2	2,9	17,6	2,3	2,1	1,2	5,2	0,9	1,5	2,7	1,4	2,1	6,1	3,64	92
Oral Cancer - IN	2,2	0	1	0	0	0	0,6	0,3	0	8,3	13,3	0	0	0,3	0	0	1,63	71
Breast Triple Negative/Lobular Cancer - UK	0	0,8	0	9,7	1	2,6	3,5	1,8	1,2	1	2,1	2,2	3,3	3,1	1,1	0,6	2,13	65
Malignant Lymphoma - DE	1,1	1,5	1	1,1	1	4,6	2,3	2,8	2,4	1	1,6	1,3	1,3	1	0	6,7	1,92	60
Lung Cancer - KR	0	4,6	1	2,2	6,9	0,7	0	2,1	3,6	1	1,6	0,9	1,3	2	0	5,5	2,09	57
Thyroid Cancer - SA	1,1	1,5	3,8	4,3	7,8	1,3	1,8	1,3	6	4,2	0,7	0,4	0	0,3	3,2	1,8	2,47	50
Pancreatic Cancer Endocrine neoplasms - AU	0	0,8	0	1,1	1	1,3	1,8	1	1,2	0	1,2	1,8	0	2,4	0	1,2	0,93	35
Bladder Urothelial Cancer - TCGA, US	2,2	3,1	1,9	0	2,9	2,6	1,8	1,8	2,4	1	0,5	0	0,7	0	0	0,6	1,34	32
Pediatric Brain Cancer - DE	0	0	1	0	0	0	1,2	1	0	0	1,2	2,2	1,3	0,7	0	1,8	0,65	29
Acute Myeloid Leukemia - KR	0	2,3	0	2,2	2	0	1,8	0	0	5,2	0,2	0,2	0	0	5,3	0	1,20	22
Rectum Adenocarcinoma - TCGA, US	0	0,8	1,9	1,1	3,9	1,3	1,2	0	0	2,1	0,2	0,2	0	0,7	1,1	1,8	1,02	22
Brain Glioblastoma Multiforme - TCGA, US	1,1	1,5	1	1,1	0	0	0	1	1,2	0	0,2	0,4	0	0,3	1,1	1,8	0,67	18
Prostate Adenocarcinoma - TCGA, US	2,2	0	0	0	0	2,6	0	0,3	0	0	0	0,9	0,7	1,4	0	0	0,51	16
Brain Lower Grade Glioma - TCGA, US	0	0,8	0	1,1	2	0	0	0,5	0	2,1	0,2	0,2	0	0,3	0	0,6	0,49	12
Kidney Renal Clear Cell Carcinoma - TCGA, US	2,2	0	1	0	0	0	1,2	0	3,6	0	0	0,2	1,3	0	1,1	0	0,66	12
Bladder Cancer - CN	1,1	0,8	0	0	0	0,7	1,8	0,5	0	2,1	0	0	0	0,3	0	0	0,46	11
Prostate Adenocarcinoma - CA	1,1	0	0	0	0	0	0	0,8	0	0	0,9	0	0	0,3	0	0	0,19	9
Kidney Renal Pap. Cell Carcinoma - TCGA, US	1,1	0	0	0	2	1,3	0,6	0	1,2	1	0	0	0	0	0	0	0,45	8
Prostate Adenocarcinoma - UK	1,1	0,8	0	0	0	1,3	0,6	0	0	0	0	0,4	0	0	0	0,6	0,30	8
Early Onset Prostate Cancer - DE	0	0,8	0	0	0	0	0,6	0	0	0	0,5	0,2	0	0	0	0,6	0,17	6
Ovarian Serous Cystadenocarcinoma - TCGA, US	2,2	0	1	1,1	0	0	0	0,3	1,2	0	0	0	0	0	0	0	0,36	6
Head and Neck Thyroid Carcinoma - TCGA, US	0	0	0	0	0	0	0	0,3	0	1	0	0,4	0	0,3	0	0	0,13	5
Esophageal Cancer - CN	0	0	0	0	0	0,7	0	0,3	0	0	0	0	0	0,7	0	0	0,11	4
Gastric Cancer - CN	0	0,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3	0	0,6	0,11	3
Benign Liver Tumour - FR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,1	0	0,13	2
Chronic Lymphocytic Leukemia - ES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,6	0,04	1
total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	3003

Tabelle 6.2: Relative Häufigkeit von in der ICGC-Datenbank gelisteten somatischen *TBX*-Mutationen bei Krebs. Die Anzahl der in 38 Krebsgenomstudien gefundenen somatischen *TBX*-Mutationen wurde für jedes der 16 *TBX*-Gene auf die Gesamtzahl aller gefundenen *TBX*-Mutationen normiert. (Die absoluten Zahlen sind Tab. 10.1 im Anhang zu entnehmen.) Die *TBX3*-Mutationen sowie die Daten der TCGA-Brustkrebsstudie sind grau hinterlegt. Die Gesamtzahl der in den einzelnen Projekten identifizierten *TBX*-Mutationen ist in der äußersten rechten Spalte gelistet.

Gene als Referenz verwendet. Tab. 10.1 (siehe Anhang) führt die Verteilung von Mutationen in 16 humanen *TBX*-Genen in verschiedenen Krebsgeweben auf. Die Brustkrebs-Daten (BRCA-US) stammen aus dem The Cancer Genome Atlas (TCGA)-Projekt, in welchem das Auftreten somatischer Mutationen in Krebsgeweben tausender Spender analysiert wurde.^[77] Aus der Tabelle geht hervor, dass *TBX3* in Brustkrebs das *TBX*-Gen mit der höchsten Mutationsrate ist.

Zum direkten Vergleich zwischen der Mutationsrate der einzelnen *TBX*-Gene wurden die in Tab. 10.1 (siehe Anhang) gelisteten *TBX*-Mutationsraten eines spezifischen Tumorgewebes auf die Gesamtzahl aller Mutationen des jeweiligen *TBX*-Gens aller gelisteten Tumorgewebe normiert (siehe Tab. 6.2). Die Normierung bestätigt *TBX3* als das am häufigsten mutierte

TBX-Gen in Brustkrebs. Die Mutationshäufigkeit war bei *TBX3* mit 17,6 % um ein 4,7-faches höher als die durchschnittliche Mutationsrate aller 16 *TBX*-Gene mit 3,6 %. In Tab. 10.2 (siehe Anhang) ist die Anzahl der Mutationen eines *TBX*-Gens in einem speziellen Tumorgewebe auf die Gesamtheit aller *TBX*-Mutationen dieses speziellen Tumorgewebes normiert. Diese Normierung erlaubt zum einen den Vergleich zwischen der Mutationsrate eines *TBX*-Gens mit der Mutationshäufigkeit eines speziellen Tumortyps und zum anderen lassen sich so die Mutationshäufigkeiten eines *TBX*-Gens in den verschiedenen Tumortypen analysieren. Bei diesem Vergleich war auffallend, dass in Brustkrebstumoren 29,3 % aller *TBX*-Mutationen *TBX3* betrafen. Hierbei korreliert die Mutationsrate nicht mit der Länge der genomischen Sequenz, da *TBX3* mit 13,9 kb um das 2-fache kleiner als das durchschnittliche *TBX*-Gen mit 29,9 kb ist. Tab. 6.2 und Tab. 10.2 (siehe Anhang) sind entsprechend der Anzahl an *TBX*-Mutationen der gelisteten Krebs-Genom-Projekte sortiert, daher sind die Ergebnisse an der Tabellenspitze signifikanter als die am Tabellenende. Während die genomische Größe der humanen *TBX*-Gene zwischen 6 kb und

TBX gene	protein length	frame shift	mis sense	stop gained	in-frame del	syn	sum
EOMES	705		3				3
T	435	1	1			2	4
TBR1	682	1	2				3
TBX1	495		1			1	2
TBX2	712	1					1
TBX3	723	15	8	1	2	1	27
TBX4	545		2	1		1	4
TBX5	518	1	5			1	7
TBX6	436						0
TBX10	385	1		1		1	3
TBX15	602		4				4
TBX18	607		5			2	7
TBX19	448		1	1			2
TBX20	447		3				3
TBX21	535					2	2
TBX22	520		6	1		1	8
sum		20	41	5	2	12	80
average mut nr/ TBX gene		1,25	2,56	0,31	0,12	0,75	

Tabelle 6.3: In Brustkrebs identifizierte, den offenen Leserahmen betreffende *TBX*-Mutationen. Das TCGA-Datenset wurde hinsichtlich fünf verschiedener, den offenen Leserahmen (ORF) der *TBX*-Gene betreffenden Mutationstypen analysiert. Die Proteinlänge ist in der zweiten Spalte gelistet. Die vorletzte Spalte listet synonyme (syn) Mutationen. Um die Häufigkeit der einzelnen Mutationstypen in *TBX3* kalkulieren zu können, wurde die durchschnittliche Anzahl an Mutationen (average mut nr/TBX gene) pro *TBX*-Gen ermittelt (unterste Spalte). sum, Zusammenfassung.

106 kb beträgt und sich die Genlängen somit um ein 17-faches unterscheiden, variieren die Proteinlängen nur um das 2-fache. Da die ICGC-Datenbank auch Mutationen in Intron-Regionen auflistet, wird die Mutationsrate auch durch die genomische Größe beeinflusst. In Tab. 6.3 sind daher alle *TBX*-Brustkrebsmutationen aufgeführt, die innerhalb des offenen Leserasters (ORF, engl.: open reading frame) der *TBX*-Gene liegen und somit von der Gengröße unabhängig sind. Dies beinhaltet die folgenden fünf Mutationstypen: 1.) Frameshift-Mutationen, die eine Leserasterverschiebung zur Folge haben; 2.) Mutationen, die ein frühzeitiges Stopp-Codon codieren; 3.) Missense-Mutationen, die einen Aminosäureaustausch bewirken; 4.) In-Frame-Deletionen, denen eine spezifische Aminosäure fehlt und 5.) synonyme Mutationen oder sog. stumme Mutationen, die keine Auswirkung auf die Funktionalität des Proteins haben. Im Vergleich zum durchschnittlichen Vorkommen eines spezifischen Mutationstyps innerhalb des ORF der *TBX*-Gene, sind in *TBX3* die Frameshift- (12x) sowie die In-frame-Mutationen (16x) sowie die Missense-Mutationen (3x) am häufigsten. Diese Anhäufung ist charakteristisch für Brustkrebs.

Die Analyse des ICGC-Datensets bezüglich *TBX3*-ORF-Mutationen (Verhältnis des kompletten ICGC-Datensets zu BRCA-US Datenset ist ca. 12:1) ergab 21 Frameshift-Mutationen (siehe Tab. 10.4 in Anhang), darunter 16 Brustkrebsmutationen. Diese 8,5-fache Anhäufung von Frameshift-Mutationen im *TBX3*-ORF ist statistisch hochsignifikant ($p < 10^{-7}$). Analog wurden zwei von fünf In-frame-Deletionen im BRCA-US-Datenset identifiziert. Das Überwiegen dieser Mutationstypen in *TBX3* im Vergleich zu anderen *TBX*-Genen spricht für eine bedeutende Rolle von *TBX3* in der Progression von Brustkrebs. Die Position der in Brustkrebstumoren gefundenen *TBX3*-Frameshift-Mutationen innerhalb der *TBX3*-Proteinsequenz weicht stark von einer Zufallsverteilung ab. Vierzehn von fünfzehn Frameshift-Mutationen waren in der N-terminalen Hälfte von *TBX3* lokalisiert, zehn davon innerhalb der T-box-Domäne (siehe Abb. 6.17). Hierbei ist ein willkürliches

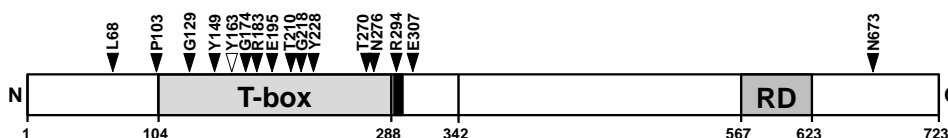


Abbildung 6.17: Die Lokalisation der bei Brustkrebs identifizierten *TBX3*-Frameshift-Mutationen. Gezeigt ist die Lokalisation der bei Brustkrebs identifizierten Frameshift-Mutationen innerhalb der *TBX3*-Proteinsequenz. Die T-box sowie die dominante Repressordomäne (RD) sind grau hinterlegt. Der schwarze Balken markiert das Kernlokalisationsignal. N, N-Terminus. C, C-Terminus.

Auftreten beider Verteilungen höchst unwahrscheinlich ($p < 5 \times 10^{-5}$ und $< 9 \times 10^{-4}$) Auch die hier analysierte Frameshift-Mutante Y163fs2* fiel in dieses Raster und wurde ebenso noch in einer weiteren Krebsstudie^[1] identifiziert.

6.3 Analyse von TBX3-Funktions-/Interaktionsmutanten

6.3.1 Die dephosphomimetische TBX3-Mutante S674A

Trotz der biologischen Bedeutung der T-box-TFs ist bisher nur sehr wenig über deren genaue Funktionsweise bekannt. Die biologische Aktivität von Proteinen wird in eukaryotischen Zellen hauptsächlich über posttranslationale Modifikationen (PTM) gesteuert.^[79] Die häufigste PTM ist die von speziellen Proteinkinasen gesteuerte Phosphorylierung.^[78,81,82] Abrahams *et al.*^[159] konnten für murines Tbx2 *in vivo* eine Phosphorylierung nachweisen und identifizierten drei Phosphorylierungsstellen innerhalb der Proteinsequenz von Tbx2 (S336, S623 und S675). Durch Vergleich der murinen Tbx2- und Tbx3-Sequenzen identifizierten Yano *et al.*^[160] zwei korrespondierende potentielle Phosphorylierungsstellen in murinem Tbx3 (S334 und S692), wobei für die Position S623 kein entsprechender Serinkandidat identifiziert werden konnte. Im Test zeigte die dephosphomimetische Tbx3-Mutante S692A einen dominant-negativen Effekt auf die Tbx3-vermittelte transkriptionelle Repression von E-Cadherin in *Tara*-KD-Zellen durch Erhöhung des E-Cadherin-Signals.^[160] Aus diesem Grund sollte der Effekt der dephosphomimetischen korrespondierenden humanen TBX3-Mutante (S674, siehe Abb. 6.18) auf die p21-Expression überprüft werden (siehe Kap. 6.3.5).

6.3.2 Die potentielle SUMOylierungs-Mutante D275K

Eine weitere wichtige PTM ist die SUMOylierung, bei der eine Enzymkaskade die Verknüpfung des Proteins SUMO an seine Substratproteine reguliert.^[91] Die SUMOylierung könnte ein konservierter Mechanismus zur Kontrolle der Aktivität von T-box-Faktoren darstellen. So basiert die Funktion des *C. elegans* TBX-2 auf SUMOylierung und auch die Säugerorthologe Tbx2 und Tbx3 können SUMOyliert werden.^[161] Da die SUMOylierung von TFs typischerweise v.a. mit Repression assoziiert wurde^[162], sollte hier der Einfluss der SUMOylierung auf die TBX3-vermittelte p21-Repression überprüft werden (siehe Kap. 6.3.5). Die potentiellen SUMOylierungsstellen von humanem TBX3 wurden mit dem Internet gestützten SUMOplot-Analyseprogramm (<http://www.abgent.com/tools>) identifiziert (siehe Tab. 6.4). Von den identifizierten SUMOylierungsstellen waren die Positionen

No.	Pos.	Group	Score	Pos. (TBX2)	Score (TBX2)	pos in OMB
1	K273	DKITQ LKID NNPFA	0,91	K264	0,91	K499
2	K242	RANDI LKLP YSTFR	0,80	K233	0,80	K 468
3	K446	EGTAP AKVE EARAL	0,79			
4	K714	VSGLE AKPD RSRSA	0,79			
5	K175	RWMVA GKAD PEMP	0,67			
6	K310	VFDER HKKE NGTSD	0,52			
7	K281	DNNPF AKGF RDTGN	0,44			
8	K118	LWDQF HKRG TEMVI	0,34			
9	K216	TNNIS DKHG FTILN	0,33			

Tabelle 6.4: Potentielle SUMOylierungsstellen innerhalb der TBX3-Proteinsequenz. Die gezeigte Tabelle listet die mit dem internetgestützten SUMOplot-Analyseprogramm (<http://www.abgent.com/tools>) identifizierten, potentiellen SUMOylierungsstellen innerhalb der TBX3-Proteinsequenz. Die beiden oberen Motive sind nahezu vollständig zwischen dem humanen TBX3-Protein und Omb aus *Drosophila* konserviert, inklusive der flankierenden Sequenzen.

K242 und K273 fast vollständig zwischen dem humanen TBX3-Protein und dem orthologen Omb aus *Drosophila* konserviert. Besonders Position K273 ist bei T-box-Proteinen hoch konserviert und entspricht dem LKIE-Motiv von *C.elegans* TBX-2.^[163] Die entsprechende K271R-Mutation verhindert die SUMOylierung von TBX22 bei gleichzeitiger Aufhebung der DNA-Bindung.^[163] Nach Andreou *et al.* ist die DNA-Bindung eine Voraussetzung für die SUMOylierung.^[163] Um die DNA-Bindung nicht zu beeinträchtigen, wurde hier nicht die entsprechende Position K273 des SUMOylierungsmotivs im humanem TBX3 mutiert, sondern die Position D275 (siehe Abb. 6.18). Durch die D275K-Mutagenese wird das LKID-SUMOylierungsmotiv zu LKIK mutiert.

6.3.3 Die potentielle dominant-negative TBX3-Mutante Y149S

Die Y149S-Mutation wurde im Rahmen einer genomischen Studie von Ulna-Mamma-Syndrom (UMS)-Patienten entdeckt.^[24] Mutationen, die zu UMS führen, betreffen die gesamte TBX3-Proteinsequenz, wobei L143P und Y149S innerhalb der T-box-Domäne lokalisiert sind.^[24] In Zellproliferationsassays führte die Expression von Y149S zu einer drastischen Inhibition der Zellproliferation von HepG2-Klonen, während die wildtypische TBX3-Expression die Proliferation im Vergleich leicht fördert.^[164] Zudem konnten transi-

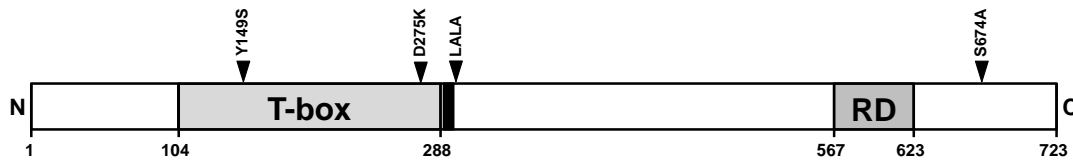


Abbildung 6.18: Lokalisation der TBX3-Funktionsmutationen im TBX3-Protein. Gezeigt ist die Lokalisation von vier zu untersuchenden Funktions-/Interaktionsmutanten innerhalb der TBX3-Proteinsequenz (Pfeilspitzen). Die T-box sowie die dominante Repressordomäne (RD) sind grau hinterlegt. Der schwarze Balken markiert das Kernlokalisationsignal. N, N-Terminus. C, C-Terminus.

ent Y149S-exprimierende ST.HdhQ111-Zellen die Seneszenz nicht umgehen, was analog für murine embryonale Fibroblastenzellen (MEFs, engl.: mouse embryonic fibroblasts) gezeigt wurde.^[37] Hierbei wird die Seneszenz-inhibierende Funktion von TBX3 auf die direkte Repression von ARF auf transkriptioneller Ebene zurückgeführt.^[37] Da TBX3 in Melanomen zur Aufrechterhaltung der Proliferation und der Unterdrückung der Seneszenz durch Repression des p21-Promotors benötigt wird^[53], sollte die dominant-negative Y149S-Mutante (siehe Abb. 6.18) bezüglich ihrer p21-Aktivität überprüft werden (siehe Kap. 6.3.5).

6.3.4 Die Rb1-Interaktionsmutante M302A/V304A

Tbx2 assoziiert über eine C-terminale Domäne mit hypophosphoryliertem Retinoblastoma Protein (Rb1)^[64], einem wichtigen Regulator von zahlreichen an der Zellzyklusprogression sowie an zellulären Differenzierungsprozessen beteiligten TFs.^[165] Die Rb1-Interaktion erfolgt über zwei Leucine an den Positionen L294 und L296. Mittels Pull-Down-Experimenten konnte gezeigt werden, dass die L294A/L296A (LALA)-Doppelmutation zwar die Rb1-Interaktion, nicht aber die DNA-Bindung von Tbx2 aufhebt. Da die Interaktion die DNA-Bindung sowie die Tbx2-vermittelte p21-Repression verstärkt^[64], sollte dies analog für TBX3 gezeigt werden (siehe Kap. 6.3.5). Hierzu wurden die dem Tbx2-Rb1-Interaktionsmotiv (L294/L296) entsprechenden Aminosäuren in TBX3 mittels Alignment (siehe Abb. 6.19) identifiziert und mutiert. Die resultierende TBX3-Mutante (M302A/V304A, siehe Abb. 6.18) wurde analog zur Tbx2-Mutante als LALA-Mutante bezeichnet.

```

DanasOMB          REKKQALMS--N-----RGSDDKLNPTH----VSSSRAPLHLGHAGRPPHLH 559
DmelOMB           REKKQALMS--N-----RGSDDKLNPTH----VSSSRAPLHLGHAGRPPHLH 560
DyakOMB           REKKQALMS--N-----RGSDDKLNPTH----VSSSRAPLHLGHAGRPPHLH 556
DpsobsOMB         REKKQALMS--N-----RGSDDKLNPTH----VSSSRAPLHLGHAGRPPHMH 583
DmojOMB           REKKQALMS--N-----RGSDDKLNPTH----VSSSRAPLHLGHAGRPPHLH 551
MonodelphisTbx2  REKKRQLTLPRLRMYEEQCKPERDGAESDASSCDPPPAR--EPPSPG---TD-PSPLR 345
MusTbx2 (711aa)   REKKRQLTLPRLRMYEEHCKPERDGAESDASSCDPPPAR--EPPSPS---AA-PSPLR 345
RattusTbx2        REKKRQLTLPRLRLYEEHCKPERDGAESDASSCDPPPAR--EPPSPS---AA-PSPLR 274
BosTbx2           REKKRQLTLPRLRLYEEHCKPERDGAESDASSCDPPPAR--EPPSPG---TA-PSPLR 345
homoTbx2          REKKRQLTLPRLRLYEEHCKPERDGAESDASSCDPPPAR--EPPTSPG---AA-PSPLR 335
PanTbx2           REKKRQLTLPRLRLYEEHCKPERDGAESDASSCDPPPAR--EPPTSPG---AA-PSPLR 335
XenopusTbx2       REKKRQLSLPSLRMYEEQCKADRGAESDASSCDPAPGR--DSLHSP---STE-PSPLR 336
DanioTbx2         REKKRQLTLPRLRMYEDQCKVDRDGAESDASSSEPTTGR--DAGHSP---PV-SSPLR 334
TakifuguTbx2      REKKRQLTLPRLRMYEDQCKADREGVSDASSSETPAGR--DQVHSP---GGG-SSPLS 351
MonodelphisTbx3  REKKRQLTLQSMRGFEEHKKKAGTS--DESSSEQTAFKCFQSSSPAAVSTVG-TSNLK 349
MacacaTbx3        REKKRQLTLQSMRVFDERHKKKENGTS--DESSSEQAAFNCFAQASSP-AVSTVG-TSNLK 366
homoTbx3          REKKRQLTLQSMRVFDERHKKKENGTS--DESSSEQAAFNCFAQASSP-AASTVG-TSNLK 366
PanTbx3           REKKRQLTLQSMRVFDERHKKKENGTS--DESSSEQAAFNCFAQASSP-AVSTVG-TSNLK 366
MusTbx3           REKKRQLTLQSMRVFEEHKKKET--S--DESSSEQAAFNCFAQASSP-AVSTVG-TSNLK 364
rattusTbx3        REKKRQLTLQSMRVFEEHKKETGTS--DESSSEQAAFNCFAQASSP-AVSTVG-TSNLK 346
XenopusTbx3       LRHRQLLALQSMRYPDDHQKKNKNGSS--DESSSEQTAYKCFQQTSSP-TAPAVG-TSSLK 348
DanioTbx3         REKKRQLLALQSMRSEYEEQKKKENGTS--DDSSGEQASFQCFRQASSP-AVSTAG-HNHLK 335
TakifuguTbx3      REKKRQLLALQSMRSEYEEQKKKENGAS--DDSSGEQAPFKCFQASSP-AVSTVG-PPHLK 362
tetraodonTbx3     REKKRQLLALQSMRSEYEEQKKKENGAS--DDSSGEQAPFKCFQASSP-AVSTVG-PPHLK 365

```

Abbildung 6.19: Alignment zur Identifikation der Tbx2-L294/L296 korrespondierenden Rb1-Interaktionsdomäne in TBX3. Gezeigt ist ein Ausschnitt eines Alignment des N-terminalen Bereichs des humanen TBX3 mit orthologen Tbx2- und Tbx3-Proteinen sowie *Drosophila* Omb zur Identifikation der Tbx2-L294/L296 korrespondierenden Rb1-Interaktionsdomäne in TBX3.

6.3.5 Einfluss der TBX3-Funktions-/Interaktionsmutanten auf die Regulation des p21-Promotors

Die zelluläre Seneszenz ist ein protektives, zelluläres anti-Tumor-Programm und wird von TBX3 durch direkte Repression des p21-Promotors unterdrückt.^[36] Um mehr über die Steuerung der TBX3-Proteinaktivität zu erfahren, wurden die beiden PTM-Funktionsmutanten D275K (SUMOylierung) und S674A (Phosphorylierung) zusammen mit der dominant-negativen Mutante Y149S sowie der Rb1-Interaktionsmutante M302A/V304A (LALA) im transienten FLuc-Reporterassay bezüglich ihrer p21-Aktivität untersucht.

Abb. 6.20 zeigt, dass die beiden PTM-Mutanten D275K und S674A sowie LALA dem normalen TBX3-Protein adäquate p21-Luc-Repressoren sind. Die p21-Luc-Repression durch TBX3 wurde von diesen Mutationen nicht beeinträchtigt. Dagegen war die p21-Repression durch Y149S ähnlich beeinträchtigt wie durch die DNA-Bindemutante TBX3dm. Das wildtypische Verhalten von D275K bezüglich des p21-Luc-Promotors legt nahe, dass die SUMOylierungsmutante keine DNA-Bindemutante ist.

Aufgrund der fehlenden Normierung wurde die Proteinexpression im Western Blot mittels FLAG-Immunodetektion überprüft. Die Pixeldichteanalyse des in Abb. 6.20 B gezeigten Western Blots (siehe Abb.6.20 D) zeigt, dass die Y149S-Expression vergleichbar mit

TBX3dm um annähernd die Hälfte schwächer als die TBX3-Expression war. Die Proteinexpression der Mutanten D275K und LALA war dagegen ca. um das 2-fache stärker als die von TBX3. S674A war im gezeigten Western Blot um sogar mehr als das 4-fache stärker exprimiert als normales TBX3. Auch nach Normierung von drei Western Blots war diese Tendenz offensichtlich (siehe Abb. 6.20 C). Ob die bei den drei Mutanten verstärkte p21-Repression auf die höhere Proteinkonzentration zurückzuführen ist, müsste in einem Experiment mit angepassten Proteinmengen bestimmt werden. Das Ergebnis lässt vermuten, dass die Mutationen D275K, LALA und S674A zu einer Stabilisierung des TBX3-Proteins führen.

Da sich die Repressionsstärke der potentiellen TBX3-Treibermutanten bezüglich der endogenen *p21*-Expression sowie des transfizierten p21-FLuc-Reporters unterschied (siehe Abb. 6.13), sollte dies mittels qPCR ebenso für die TBX3-Funktionsmutanten überprüft werden. Wie aus Abb. 6.20 E ersichtlich, führten die beiden PTM-Mutanten D275K und S674A, sowie die LALA im Vergleich zu TBX3 zu einer signifikant besseren Repression der endogenen *p21*-Aktivität. Dagegen war die p21-Repression durch die drei Varianten im Reporterassay vergleichbar zu der von TBX3. Obwohl die Y149S-Mutation die p21-Repression im Reporterassay einschränkte, zeigte Y149S keinen Unterschied zur endogenen *p21*-Repression im Vergleich zum normalen TBX3. TBX3dm hatte dagegen keinen Einfluss auf die endogene *p21*-Expression. Dieses Ergebnis zeigte für die Mutante Y149S einen Unterschied zwischen der endogenen *p21*-Repression und der p21-FLuc-Repression im Reporterassay. D275K, LALA und S674A waren, womöglich aufgrund der stärkeren Proteinexpression (siehe Abb. 6.20 B), bessere endogene *p21*-Repressoren als normales TBX3.

Da für die potentiellen TBX3-Treibermutanten vermutet wurde, dass die Unterschiede im Proteinlevel auf Unterschieden der RNA-Produktion bzw. im RNA-Turn-over basieren (siehe Kap. 6.2.10), sollte dies analog für die beiden PTM-Mutanten D275K und S674A, für die Rb1-Interaktionsmutante LALA und die dominant-negative Mutante Y149S nach transients Transfektion in COS-7-Zellen mittels qPCR überprüft werden. Die Transkriptionsrate der Mutanten Y149S, LALA und S674A war im Vergleich zum normalen *TBX3* signifikant geringer (siehe Abb. 6.20 F). Dagegen war die Transkriptionsrate von D275K identisch mit der von *TBX3* und TBX3dm.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die geringe Y149S-Proteinexpression auf einem

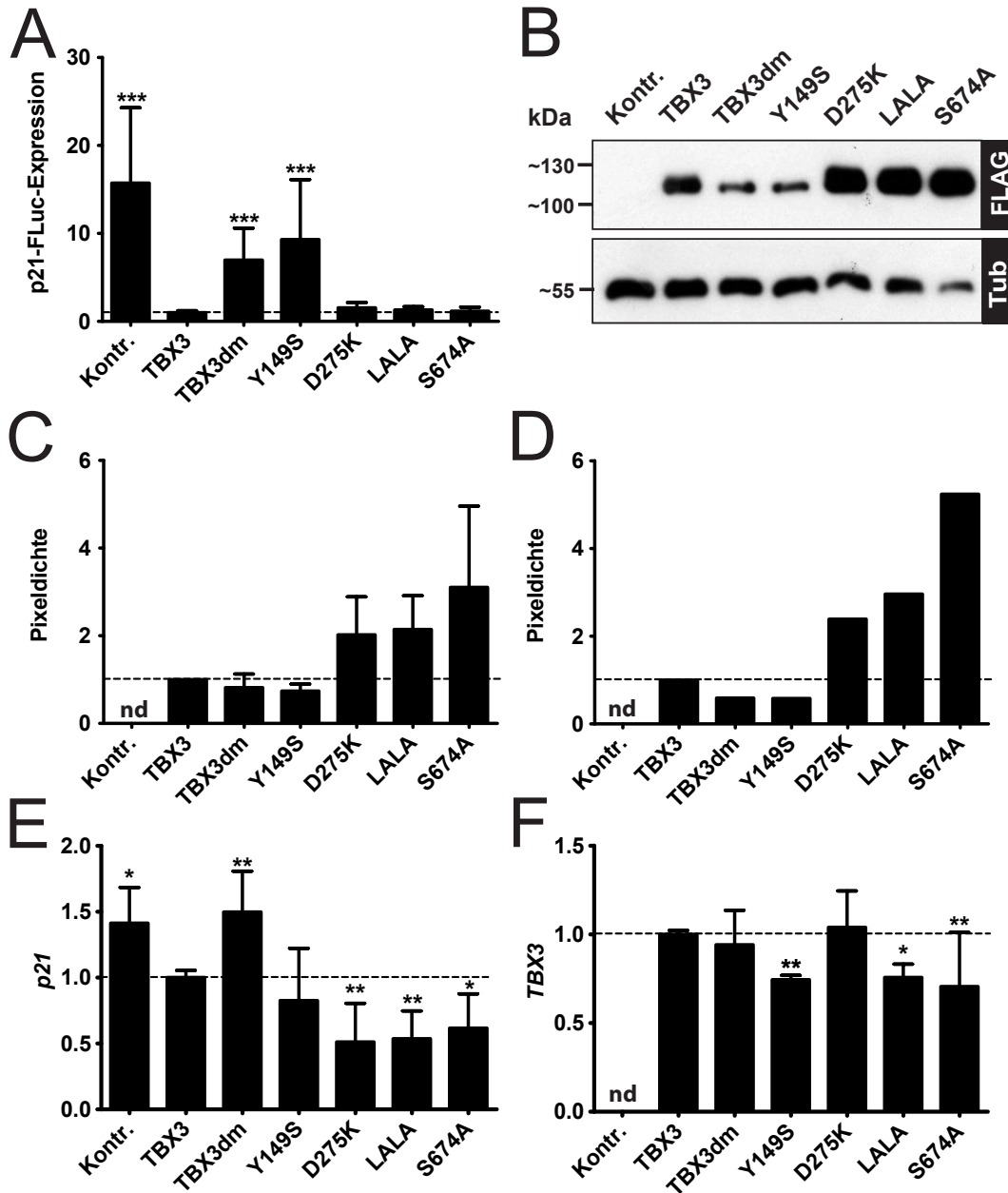


Abbildung 6.20: Einfluss der TBX3-Funktionsmutanten auf die Regulation des p21-Promotors. COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden mit den für die gezeigten TBX-Varianten codierenden Konstrukte bzw. dem Leervektor pT-REx/GW-30/lacZ (Kontr., 0,25 μ g/ml/0,5 μ g/ml) und für den Reporterassay mit dem Reporterkonstrukt p21-FLuc (0,25 μ g/ml) mittels FuGENE HD (3 μ l/ml) cotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität gemessen bzw. die RNA extrahiert. (A) Der p21-FLuc-Reporterassay zeigt den Einfluss der TBX3-Mutanten auf die p21-regulierte Reporteraktivität. Gezeigt ist der Mittelwert ($n=6$) plus SD. (B) Die TBX3-Proteine aus Zellysaten der Reportertransfektion wurden im Western Blot mittels FLAG-Immunodetektion quantifiziert. Die Kontrolle des Gesamtproteins erfolgte mittels anti-alpha-Tubulin (Tub). Gezeigt ist ein exemplarischer Versuch. (C) Pixeldichteanalyse von drei Western Blots zur Überprüfung der Proteinexpression der TBX3-Varianten. (D) Pixeldichteanalyse des in (B) gezeigten Western Blots. Die Tubulin normierten TBX-Werte wurden jeweils auf TBX3 normiert. Die Analyse der endogenen p21-Expression (E) sowie der TBX3-Expression (F) erfolgte mittels qPCR. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert ($n=3$) plus SD. Signifikante Unterschiede wurden mit one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest relativ zu TBX3 berechnet. FLuc; Firefly Luciferase. nd, nicht detektiert.

niedrigen Transkriptionslevel basiert. Trotz gleicher Transkriptionsrate wie TBX3, scheint die Proteinexpression von D275K erhöht. Die Mutanten LALA und S674A zeigen trotz niedrigerem Transkriptionslevel eine starke Proteinexpression (siehe Abb. 6.20 B).

6.3.6 Der Einfluss von Co-Repressoren auf die TBX3-abhängige p21-Regulation

Häufig rekrutieren TFs modulierende Co-Regulatoren, um an die DNA-Sequenzen von Promotor- und Enhancerregionen zu binden. Somit könnte auch die von den T-box-Faktoren TBX2/3 vermittelte Repression über assoziierte Co-Repressoren gesteuert werden. Zu den bekanntesten Co-Repressoren zählen die Mitglieder der Groucho (Gro)/TLE-Genfamilie. Farin *et al.*^[166] zeigten, dass die über die beiden murinen T-box-Faktoren Tbx18 und Tbx15 vermittelte Repression von Gro-Co-Repressoren abhängig ist. Zebrafisch Brachyury sowie Tbx24 Orthologe interagierten mit Mitgliedern der Ripply-Genfamilie^[167], deren Bindung einen Gro/TLE-Co-Repressorkomplex benötigt. Viele Co-Repressorkomplexe enthalten Histon-Deacetylasen (HDAC) und für die Tbx2 vermittelte Repression wurde eine Rekrutierung von HDAC1 zum p21-Promotor nachgewiesen.^[53] Auch für die TBX3-vermittelte p14-Repression konnte eine Interaktion mit HDACs nachgewiesen werden.^[139] Viele TFs interagieren mit der Gro-WD-Domäne über zwei Klassen von Peptidmotiven: WRPW und FxlxxL.^[100] Die Analyse der TBX3-Sequenz bezüglich solcher Peptidmotive ergab eine potentielle Gro-Bindestelle (GroBS) im N-Terminus (siehe Abb. 6.21 und 6.22). Ebenso bekannt ist die Co-Repressorfamilie der C-terminalen Bindeproteine (CtBP). CtBPs fördern durch die Repression von Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin die Epithelial-

```

homoTbx3          -----MSLSMRDPVIPGTS-MAYHPFLP--HRAPDFAMSAVLG----- 35
PanTbx3           -----MSLSMRDPVIPGTS-MAYHPFLP--HRAPDFAMSAVLG----- 35
MacacaTbx3        -----MSLSMRDPVIPGTS-MAYHPFLP--HRAPDFAMSAVLG----- 35
MusTbx3           -----MSLSMRDPVIPGTS-MAYHPFLP--HRAPDFAMSAVLG----- 35
rattusTbx3        -----MSLSMRDPVIPGTS-MAYHPFLP--HRAPDFAMSAVLG----- 35
bosTbx3           -----MSLSMRDPVIPGTS-MAYHPFLP--HRAPDFAMSAVLG----- 35
canisTbx3         -----MSLSMRDPVIPGTS-MAYHPFLP--HRAPDFAMSAVLG----- 35
MonodelphisTbx3  -----LSLPMREPVIPGTS-MAYHPFLP--HRAPDFGMSAVLG----- 35
XenopusTbx3      -----MNLPMRDPVIGSS-MAYHPFLS--HRAPDFAMSAVLG----- 35
TakifuguTbx3     -----MNFLMRDPVIQSS-MAYHPFIP--HRGPELAMSAAMLG----- 35
tetraodonTbx3    -----MNFLMRDPVIQSS-MAYHPFIP--HRGPELAMSAAMLG----- 35
DanioTbx3        -----MNFLMRDPVIQSS-MAYHPFIP--HRGPELAMSAAMLG----- 21
CeTBX2           -----MAFNPFAL--GRPD----- 12
Dme1OMB          MRYDVQELLFHQSAEDPFARFANGMAYHPFLQLTQRPTEFSVSSLLTAGSNNNNSGNTNS 60

```

Abbildung 6.21: Alignment zur Identifikation potentieller Groucho-Interaktionsdomänen in TBX3. Gezeigt ist ein Ausschnitt eines Alignment des N-terminalen Bereichs des humanen TBX3 mit orthologen Tbx2- und Tbx3-Proteinen sowie *Drosophila* Omb zur Identifikation der potentiellen Groucho-Interaktionsdomäne in TBX3.

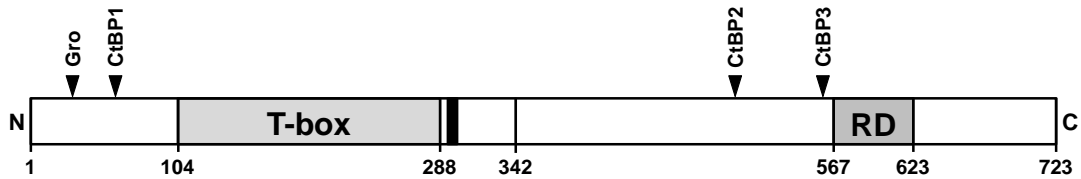


Abbildung 6.22: Lokalisation der potentiellen Gro/CtBP-Co-Repressorbindestellen im TBX3-Protein. Gezeigt ist die Lokalisation potentiellen Bindestellen für Gro- bzw. CtBP-Co-Repressoren im TBX3-Protein. Die T-box sowie die dominante Repressordomäne (RD) sind grau hinterlegt. Der schwarze Balken markiert das Kernlokalisierungssignal. N, N-Terminus. C, C-Terminus.

Mesenchymale Transition (EMT).^[115] Die Überexpression von TBX2 und TBX3 fördern ebenso Anoikis und EMT^[68] und beide sind Repressoren von E-Cadherin^[71,72]. Die Rekrutierung der CtBP-Co-Repressoren zum Zielpromotor erfolgt häufig über ein PxDLS-Motiv im Interaktionspartner. Um herauszufinden, ob TBX3 zur Repression des p21-Promotors CtBPs rekrutiert, wurden drei potentielle CtBP-Motive mutiert (CtBP1, PGALA [Position 57]; CtBP2, PLFLH [Position 497] und CtBP3, PFHLQ [Position 559]; siehe Abb. 6.22). Zum Ausschluss von Redundanz wurden die Doppelmutante CtBP2-3 (Position 497 und 559), die Dreifachmutante CtBP1-2-3 (Position 57, 497 und 559) sowie die Vierfachmutante Gro/CtBP1-2-3 analysiert.

Der Einfluss der Co-Repressoren Gro und CtBP auf die TBX3-abhängige p21-Repression wurde im transienten FLuc-Reporterassay überprüft. Alle getesteten TBX3-Varianten mit Mutation der potentiellen Interaktionsdomänen für Gro- und CtBP-Co-Repressoren erwiesen sich im FLuc-Reporterassay ohne Ausnahme als potente p21-Repressoren (siehe Abb. 6.23 A). Dieses Ergebnis konnte im p21-GLuc-Assay (siehe Abb. 6.23 C) bestätigt werden. Da für den FLuc-Assay, entsprechend Kap. 6.2.5, keine Normierung erfolgen konnte, wurde die Proteinmenge eines FLuc-Experiments im Western Blot durch FLAG-Immundetektion überprüft. Die Kontrolle der Proteinmenge zeigte vergleichbare Expressionslevels (siehe Abb. 6.23 B).

Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass die potentiellen Gro- und CtBP-Interaktionsstellen bei der TBX3-regulierten p21-Repression *in vitro* keine Rolle spielen. Daher wurde nun der Einfluss von drei ausgewählten TBX3-Interaktionsmutanten für Gro- und CtBP-Co-Repressoren (CtBP1-2-3, GroBS und GroBS/CtBP1-2-3) bezüglich der endogenen p21-Expression mittels qPCR untersucht. Abb. 6.23 zeigt für alle drei getesteten Mutanten eine dem wildtypischen TBX3-Protein vergleichbare, endogene p21-Expression. Nur CtBP1-2-3

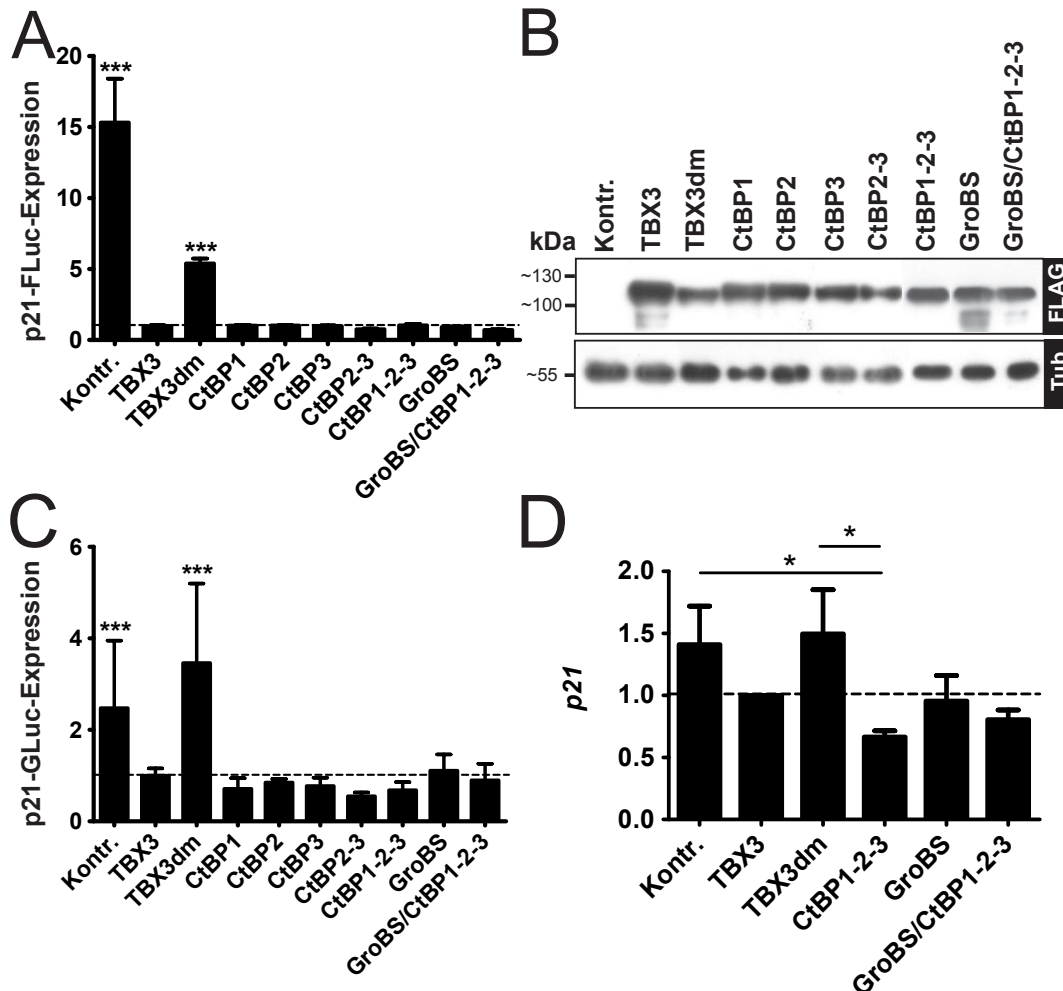


Abbildung 6.23: Einfluss von Co-Repressoren auf die TBX3-vermittelte p21-Repression. COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden mit den für die gezeigten TBX-Varianten codierenden Konstrukte bzw. dem Leervektor pT-REx/GW-30/lacZ (Kontr., 0,05 μ g/ml bzw. 0,25 μ g/ml) sowie für die Reporterassays mit den Reportergenkonstrukten p21-GLuc und pGL3-Control (0,5 μ g/ml, 10:1) bzw. p21-FLuc (0,25 μ g/ml) mittels FuGENE HD (3 μ l/ml) cotransfiziert. Die Zellen wurden nach 48 h lysiert und die Luciferase-Aktivität gemessen bzw. die RNA extrahiert. (A) Gezeigt ist der Mittelwert des p21-FLuc-Reporterassays (n=2) plus SD. (B) Die TBX3-Expression aus Zellysaten der in (A) gezeigten Reporterassays wurden im Western Blot mittels FLAG-Immunodetektion quantifiziert. Mittels anti-alpha-Tubulin (Tub) wurde das Gesamtprotein überprüft. (C) Gezeigt ist der Mittelwert des FLuc-normierten p21-GLuc-Reporterassays (n=2) plus SD. (D) Die Analyse der endogenen p21-Expression erfolgte mittels qPCR. Gezeigt ist der Mittelwert (n=3) plus SD. Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest relativ zu TBX3 (A, C) berechnet oder relativ zu Kontr. und TBX3dm (D).

zeigte bezüglich TBX3 eine signifikant bessere p21-Repression.

Dieses Ergebnis lässt für die drei exemplarisch getesteten TBX3-Interaktionsmutanten (CtBP1-2-3, GroBS und GroBS/CtBP1-2-3) vermuten, dass die potentiellen Gro- und CtBP-Interaktionsstellen bei der TBX3-regulierten p21-Repression auch *in vivo* keine wichtige Rolle spielen.

6.4 Generierung einer Zelllinie als Screeningsystem zur Identifizierung TBX2-inhibierender Wirkstoffe

6.4.1 Konzeption

Das Ziel dieses Projekts war die Entwicklung und Etablierung einer Reporterzelllinie zur Identifizierung von TBX2-inhibierenden, pharmakologisch aktiven Substanzen im Hochdurchsatzscreening (HDS). Als Read-out sollte die Fluoreszenz auf Einzelzellebene mittels Fluoreszenzmikroskopie im Mikroplattenformat gemessen werden. Die Zelllinie sollte TBX2 und das Reporterogen d2EGFP (engl.: destabilized Enhanced Green Fluorescent Protein) exprimieren, wobei die TBX2-Aktivität indirekt über die d2EGFP-Expression quantifiziert werden kann. Um dies zu gewährleisten, wurde das Reporterogen d2EGFP unter Kontrolle des p21-Promotors exprimiert, da TBX2 ein starker Repressor des p21-Promotors ist^[36] (siehe Kap. 3.5). Das destabilisierte d2EGFP hat aufgrund der eingefügten PEST-Sequenzen eine Halbwertszeit von 2 h.^[168] Daher erlaubt es eine präzise Messung transienter Genaktivierung und ist ideal zur Verwendung in quantitativen Reporterassays geeignet. Da die ektopische Überexpression von TBX2 zur genomischen Instabilität von Zellen führt^[58] und auf einige Zelllinien wie HEK 293 toxisch wirkt^[141], sollte eine konstitutive TBX2-Expression vermieden werden. Die Regulierbarkeit der TBX2-Expression wurde durch die Verwendung des Tet-On-Systems zur gezielten Aktivierung der Genexpression ermöglicht. Das hier verwendete System basiert auf zwei Komponenten, dem Regulatorplasmid pEF1 α -Tet3G und dem Antwortplasmid pTRE3G-TBX2. Zudem wurde für das Screeningsystem ein p21-reguliertes d2EGFP-Reporterogen benötigt. Für einen zellulären HDS-Assay ist es zeit- und kostenintensiv, die benötigten Zellen kontinuierlich durch transiente Transfektion zu produzieren. Daher sollten die drei für das Reportersystem benötigten Zielgene stabil in das zelluläre Genom integriert werden. Dadurch sollten auch hohe intra- und interexperimentelle Variabilität vermieden werden^[169], um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Versuchen zu gewährleisten. Als Wirtszelllinie wurde die aus Nierengewebe der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*) etablierte Fibroblasten-Zelllinie COS-7 gewählt^[170]. Diese wird häufig in zellbiologischen Experimenten eingesetzt.

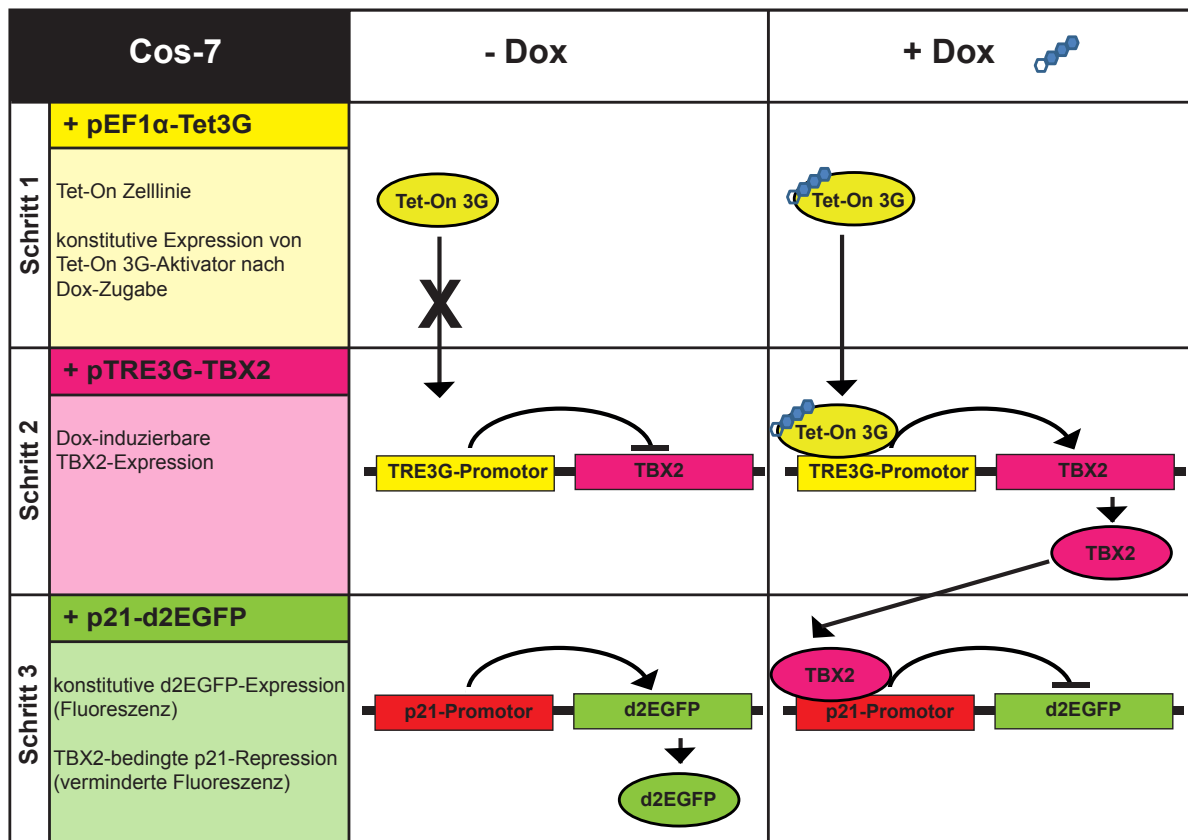


Abbildung 6.24: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte zur Generierung einer stabilen Zelllinie zur Identifizierung von TBX2-Inhibierenden Substanzen. In Abwesenheit von Dox wird konstitutiv das Tet-On 3G-Aktivatorprotein und das p21-regulierte d2EGFP-Reportergen exprimiert. Nach Zugabe bindet Dox an Tet-On 3G, wodurch dieses durch Bindung an den TRE3G-Promotor die nachgeschaltete TBX2-Expression aktiviert. Synthetisiertes TBX2-Protein inhibiert durch Repression des p21-Promotors die d2EGFP-Expression.

Sie ist einfach zu kultivieren und zu transfizieren. Zelllinien wie COS-7 sind ideal zum Einsatz in Reporterassays, da ihre Adhärenz ein schnelles und unkompliziertes Messen von Bioassays mit Mikroplatten-Readern ermöglicht, so dass in einem kurzen Zeitraum eine Vielzahl von Substanzbehandlungen getestet werden können. Endogenes TBX2-Protein würde die Stabilität und die Zuverlässigkeit des Reporterassays negativ beeinflussen, da Schwankungen der endogenen TBX2-Expression ebenso die Expression des p21-regulierten d2EGFP-Reportergens beeinflussen würden. Da COS-7-Zellen, wie in Abb. 6.26 gezeigt, kein endogenes TBX2-Protein exprimieren, wurde sichergestellt, dass die p21-regulierte d2EGFP-Expression exklusiv durch das induzierte TBX2-Protein reguliert wurde.

Die zu etablierende Zelllinie ermöglicht als autonomes Modell nach Zugabe der zu testenden pharmakologisch aktiven Substanzen ein schnelles und einfaches Screening. Zuerst wurde als erste Komponente des Tet-On-Systems das Regulatorplasmid pEF1α-Tet3G stabil

in das Genom der Zielzelllinie COS-7 integriert, woraus die Bezeichnung COS-7/pEF1 α -Tet3G resultierte (siehe Abb. 6.24). Der Vektor codiert für das konstitutiv exprimierte Tet-On 3G-Aktivatorprotein.^[171]

Im zweiten Schritt wurde als zweite Komponente des Tet-On-Systems das Antwortplasmid pTRE3G-TBX2 stabil in das Genom der Zelllinie COS-7/pEF1 α -Tet3G integriert, was zur Bezeichnung der Zelllinie COS-7/pEF1 α -Tet3G/pTRE3G-TBX2 führte (siehe Abb. 6.24). In diesem Konstrukt steht TBX2 unter der Kontrolle des induzierbaren TRE3G-Promotors. Dieser enthält 7 Wiederholungen einer 19 bp umfassenden Tet-Operatorsequenz (TetO), welche einem minimalen CMV-Promotor vorgelagert sind. Die Zelllinie exprimierte neben konstitutivem Tet-On 3G auch induzierbares TBX2-Protein.

Im dritten Schritt wurde der Reportergenvektor p21-d2EGFP stabil in das Genom der Zelllinie COS-7/pEF1 α -Tet3G/pTRE3G-TBX2 integriert (siehe Abb. 6.24). Die dreifach stabile Zelllinie COS-7/pEF1 α -Tet3G/pTRE3G-TBX2/p21-d2EGFP sollte konstitutiv das Tet-On 3G-Aktivatorprotein und über die Fluoreszenz direkt detektierbares d2EGFP exprimieren. Die Zugabe von Dox ermöglicht dem Tet-On 3G-Aktivatorprotein die Bindung an die TetO-Sequenz im TRE3G-Promotor und induziert die TBX2-Expression. Gebildetes TBX2-Protein reprimiert über die Bindung an den p21-Promotor die d2EGFP-Expression. Somit spiegelt sich die TBX2-Aktivität in der Intensität der Fluoreszenz wieder.

Die isolierten Klone wurden schnell und einfach mittels transienter Transfektion auf die Expression der stabil zu integrierenden Zielgene überprüft, was zugleich eine Einschätzung der Funktionalität der stabilen Klone ermöglichte. Als Indikator für die TBX2-Inhibierung sollte eine Steigerung der Fluoreszenzintensität vergleichbar zu der unbehandelten Kontrolle gewertet werden.

6.4.2 Bestimmung der optimalen Doxyzyklin-Konzentration zur induzierten Genexpression

Die Bestimmung der optimalen Dox-Konzentration erfolgte im Luciferase-Reportergenassay. Hierzu wurden COS-7-Zellen transient mit dem für das Tet-On 3G-Regulatorprotein codierenden pEF1 α -Tet3G-Plasmid und dem für die Firefly-Luciferase (FLuc) codierenden Response-Plasmid pTRE3G-Luc cotransfiziert. Wie im Hersteller-Protokoll „Tet-On[®] 3G Inducible Expression Systems“ (Clontech) beschrieben, erfolgte die Induktion mit Dox 4 h

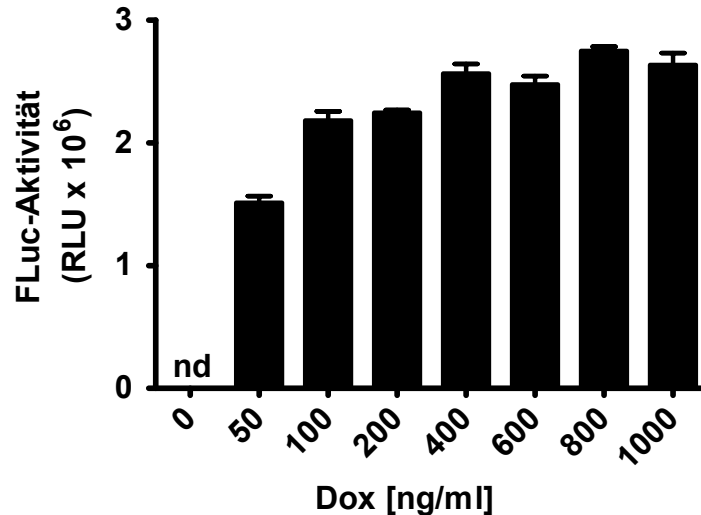


Abbildung 6.25: Bestimmung der zur Induktion von pTRE3G-regulierten Genen optimalen Dox-Konzentration. COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden mit den Plasmiden pEF1 α -Tet3G (0,5 μ g/ml) und pTRE3G-Luc (0,5 μ g/ml) mittels FuGENE HD (3 μ l/ml) cotransfiziert. 4 h post Transfektion erfolgte die Induktion mit den gezeigten Dox-Konzentrationen. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die FLuc-Aktivität gemessen. Gezeigt ist ein Versuch gemessen in Triplikaten plus SD. Dox, Doxyzyklin. FLuc, Firefly Luciferase. nd, nicht detektiert. RLU, Relative Light Units.

post Transfektion. 48 h später wurde die Luciferase-Aktivität quantifiziert.

Abb. 6.25 zeigt, dass wie zu erwarten in Abwesenheit von Dox keine Luciferase-Aktivität ermittelt werden konnte. Erst durch die Zugabe von Dox wurde eine signifikante Luciferase-Aktivität gemessen. Höhere Dox-Konzentrationen resultierten in einer höheren Luciferase-Aktivität, wobei bei Konzentration ab 400 ng/ml ein Plateau erzielt wurde. Basierend auf diesem Ergebnis wurde für die Folgeexperimente zur Induktion eine Dox-Konzentration von 400 ng/ml im Medium festgelegt.

6.4.3 Die p21-Repression des Dox-induzierten TBX2-Proteins

Nun sollte die Induzierbarkeit der TBX2-Expression in Kombination mit der p21-Aktivität des induzierten TBX2-Proteins im transienten GLuc-Reporterassay überprüft werden. Die Induktion mit Dox erfolgte 4 h nach der Transfektion. 48 h nach Induktion wurde die GLuc-Aktivität im Überstand gemessen und die Zellen lysiert. Der TBX2-Proteingehalt der Zellysate wurde anschließend im Western Blot quantifiziert.

Abb. 6.26 A zeigt, dass die p21-Aktivität im GLuc-Reporterassay nach TBX2-Induktion signifikant um mehr als die Hälfte zurückging, was den Angaben der Literatur entspricht.^[159] Der Nachweis des 3xFLAG markierten TBX2-Proteins erfolgte im Western

Blot mittels spezifischem FLAG-Antikörper (siehe Abb. 6.26 B). Zusätzlich wurden COS-7-Zellen mittels spezifischem TBX2-Antikörper hinsichtlich der endogenen TBX2-Expression überprüft (siehe Abb. 6.26 C). Abb. 6.26 B und C zeigen, dass wie erwartet, jeweils nur bei Dox-induzierten Zellen TBX2-Protein bei der zu erwartenden Größe von ca. 90 - 100 kDa detektiert wurde. Bei der unbehandelten Kontrolle wurde kein TBX2-Protein nachgewiesen, was bestätigt, dass COS-7 kein endogenes TBX2-Protein exprimieren und die TBX2-Expression exklusiv nach Dox-Zugabe aktiviert wurde. Die Dox-Zugabe führte zur Bindung des vom pEF1 α -Tet3G-Plasmid codierten Tet-On 3G-Aktivatorproteins an die TetO-Region des TRE3G-Promotors und aktivierte dadurch die nachgeschaltete TBX2-Expression.

Die Daten zeigen, dass nach transienter Transfektion von pTR3G-TBX2-Vektor TBX2-Protein induziert wurde, welches im Luciferase-Reportergenassay wiederum die p21-Aktivität reprimierte.

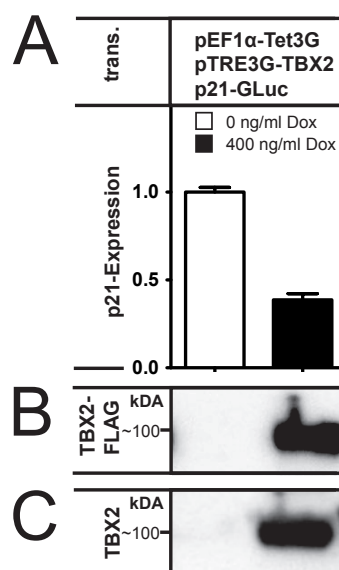


Abbildung 6.26: Die Dox-induzierte TBX2-Expression reprimiert den p21-Promotor. COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden mit den Plasmiden pEF1 α -Tet3G (0,333 μ g/ml), pTRE3G-TBX2 (0,333 μ g/ml) und p21-GLuc (0,333 μ g/ml) mittels FuGENE HD (3 μ l/ml) cotransfiziert. 4 h post Transfektion erfolgte die Induktion mit 400 ng/ml Dox. Nach 48 h wurden Zelllysate hergestellt. (A) Die GLuc-Aktivität wurde auf unbehandelte Zellen normiert. Gezeigt sind die Mittelwerte plus SD. (B, C) Der Nachweis von TBX2-Protein erfolgte im Western Blot. Die Zelllysate (30 μ g Gesamtprotein) wurden in einem 10 %-igem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend geblottet. Die Detektion von TBX2-Protein (TBX2-3xFLAG) im Western Blot erfolgte mittels anti-FLAG-Antikörper (B) bzw. anti-TBX2-Antikörper (C). Dox, Doxyzyklin. kDa, Kilodalton. trans., transient.

6.4.4 Schritt 1: die stabile, Tet-On 3G-exprimierende Zelllinie

Um eine Zelllinie mit einer konstitutiven Tet-On 3G-Expression zu erhalten, wurde im ersten Schritt das für das Tet-On 3G-Aktivatorprotein codierende Plasmid pEF1 α -Tet3G stabil in das Genom der Zielzelllinie COS-7 integriert, wobei die Selektion mit G418 erfolgte. Der im Vektor integrierte Neomycin-Selektionsmarker codiert für die bakterielle Aminoglycosid-Phosphotransferase (APT).^[172] Plasmidhaltige Zellen überlebten, da APT Aminoglycoside wie z.B. G418 phosphoryliert und so die Wirkung von G418 als Hemmer der Proteinbiosynthese aufhebt. Aus zwei Transfektionsansätzen (A und B) konnten insgesamt 29 Klone (#A1 - 12; #B1 - 17) isoliert und expandiert werden.

Zur Überprüfung der isolierten COS-7/pEF1 α -Tet3G-Klone hinsichtlich der Induzierbarkeit des konstitutiv exprimierten Tet-On 3G-Aktivatorproteins wurde ein Luciferase-Reporterassay durchgeführt. Dafür wurden konfluente Klone in gleichen Teilen auf drei Wells einer 12 Well-Platte verteilt. Ein Well diente als Erhaltungskultur und die anderen beiden Wells wurden transient mit dem pTRE3G-Luc-Plasmid transfiziert. Im pTRE3G-Luc Vektor kontrolliert der aktivierbare TRE3G-Promotor das für die FLuc codierende Gen, d.h. durch Dox-Induktion wurde in Klonen mit konstitutiver Tet-On 3G-Proteinexpression aktiv FLuc exprimiert. 4 h post Transfektion wurde das Medium gewechselt, wobei ein Ansatz mit Dox induziert wurde und einer als Kontrolle unbehandelt blieb.

Bei allen getesteten Klonen wurden signifikant höhere RLU-Werte der induzierten Proben gemessen verglichen mit den nicht induzierten (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die Transkription von FLuc durch die Zugabe von Dox aktiviert wurde. Somit ist davon auszugehen, dass alle Klone das pEF1 α -Tet3G-Konstrukt stabil in ihrem Genom integrierten und Tet-On 3G-Protein konstitutiv exprimierten. Da die RLU-Werte der jeweils unbehandelten Klone leicht variierten und um eine bessere Vergleichbarkeit der verschiedenen Klone zur erreichen, wurde auf die jeweils nicht induzierte Probe normiert (siehe Abb. 6.27). Die resultierende FLuc-Fold Induction variierte stark zwischen den verschiedenen Klonen. So wurde bei Klon #A6 nach Induktion die höchste FLuc-Fold Induction ermittelt (ca. 75.000) und die niedrigste bei Klon #B12 (ca. 100). Die Klone mit der höchsten FLuc-Fold Induction sind entsprechend ihrer Reihenfolge auf der X-Achse: #A1, #A3, #A5, #A6, #A9 und #B5. Diese wurden für die folgenden Schritte verwendet (Schritt 2, siehe Kap. 6.4.5).

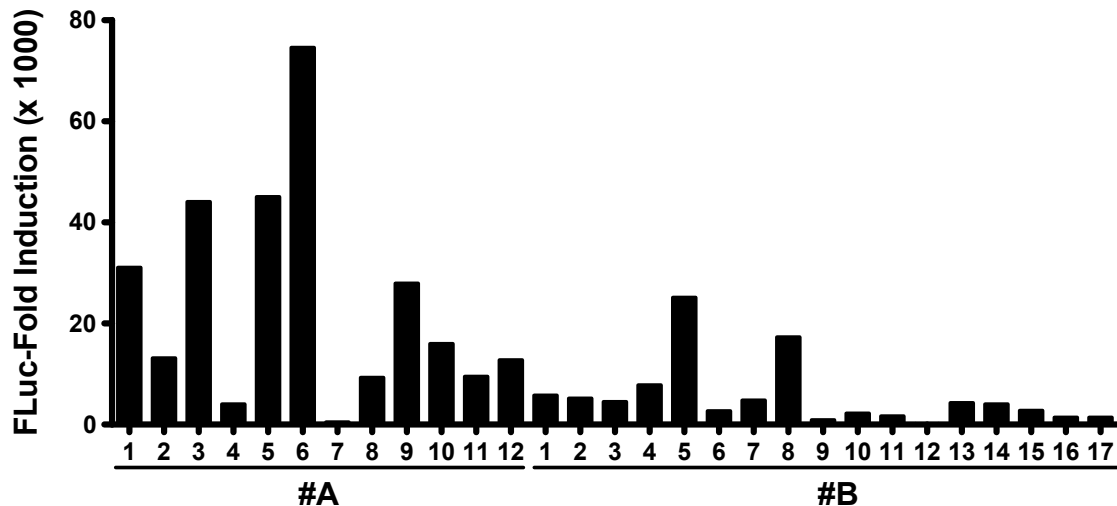


Abbildung 6.27: Überprüfung der stabilen COS-7/pEF1 α -Tet3G-Klone auf Expression von Tet-On 3G-Aktivatorprotein. COS-7/pEF1 α -Tet3G-Zellklone (#A1-12; #B1-17) wurden transient mit dem Plasmid pTRE3G-Luc (1 μ g/ml) mittels FuGENE HD (3 μ l/ml) transfiziert. 4 h post Transfektion erfolgte die Induktion mit einer Dox-Konzentration von 400 ng/ml bzw. 0 ng/ml bei der unbehandelten Kontrolle. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die FLuc-Luciferase-Aktivität gemessen. Die FLuc-Fold Induction wurde aus dem Quotienten der gemessenen RLU-Werte von maximaler (400 ng/ml) zur basalen Genexpression (0 ng/ml) bestimmt. FLuc, Firefly-Luciferase.

6.4.5 Schritt 2: die stabile Zelllinie mit konstitutiver Tet-On 3G-Expression und Dox-induzierbarer TBX2-Expression

Mit dem Ziel, eine geeignete, stabile COS-7/pEF1 α -Tet3G-Zelllinie zur Herstellung einer zweifach stabilen Zelllinie zu finden, wurden die Klone mit der besten FLuc-Fold Induktion (#A1, #A3, #A5, #A6, #A9 und #B5) aus Kap. 6.4.4 transient mit pTRE3G-TBX2 und p21-GLuc cotransfiziert. Analog zu Abb. 6.26 wurde die p21-Repression durch das induzierte TBX2-Protein im GLuc-Reportergenassay überprüft. Zusätzlich sollte die Dox-induzierte TBX2-Proteinexpression im Western Blot analysiert werden.

Abb. 6.28 A zeigt, dass im GLuc-Reportergenassay bei allen transfizierten Klonen nach Dox-Induktion eine verminderte p21-Expression gemessen wurde. Die p21-Expression der transient transfizierten Klone #A1, #A3 und #A6 lag unterhalb von 50% der p21-Aktivität der unbehandelten Proben. Um die Klone hinsichtlich der induzierten TBX2-Expression zu überprüfen, wurde die TBX2-Proteinexpression mittels Western Blot quantifiziert. Mittels FLAG-spezifischem Antikörper konnte bei allen Klonen nur nach Dox-Zugabe TBX2-Protein nachgewiesen werden (siehe Abb. 6.28 B). Die uninduzierten Kontrollen zeigten

keine TBX2-Proteinexpression. Dies weist darauf hin, dass alle getesteten COS-7/pEF1 α -Tet3G-Klone, wie erwartet, das Tet-On 3G-Aktivatorprotein exprimierten. Dieses konnte nach Dox-Zugabe die vom TRE3G-Promotor kontrollierte TBX2-Expression aktivieren, was zu einer Repression der p21-Aktivität führte. Da die Klone #A1, #A3 und #A6 nach transienter Transfektion im GLuc-Reporterassay die stärkste p21-Repression zeigten und eine nachweisbare Menge an TBX2-Protein induziert werden konnte, wurden diese Klone als Kandidaten zur Herstellung der doppelt stabilen Zelllinie gewählt.

Da bei den transient transfizierten klonalen COS-7/pEF1 α -Tet3G-Zelllinien nach Induktion TBX2-Protein nachgewiesen werden konnte, welches wiederum im Reporterassay die p21-Aktivität reprimierte (siehe Abb. 6.28), sollte nun eine stabile Tet-On-Zelllinie mit Dox-induzierbarer TBX2-Expression hergestellt werden. Nach erneuter Überprüfung der FLuc-Induktion (Daten nicht gezeigt) wurden die stabilen Tet-On 3G exprimierenden COS-7/pEF1 α -Tet3G-Klone #A1 und #A6 als Wirtszelllinien gewählt. Beide Zelllinien

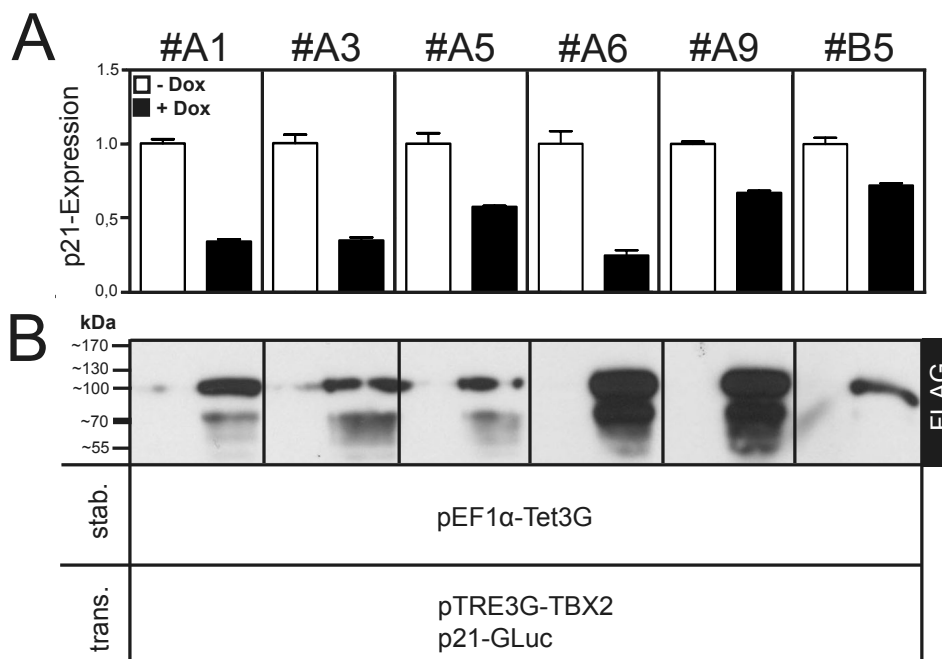


Abbildung 6.28: Einfluss der induzierten TBX2-Expression auf die p21-Promotoraktivität in transient mit pTRE3G-TBX2 und p21-GLuc cotransfizierten COS-7/pEF1 α -Tet3G-Klonen. Die COS-7/pEF1 α -Tet3G-Klone (10^5 /ml) wurden mit den Plasmiden pTRE3G-TBX2 (0,5 μ g/ml) und p21-GLuc (0,5 μ g/ml) mittels FuGENE HD (3 μ l/ml) cotransfiziert. 4 h post Transfektion erfolgte die Induktion mit den gezeigten Dox-Konzentrationen. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert. (A) Der GLuc-Reporterassay zur Bestimmung der p21-Aktivität wurde in Duplikaten gemessen. Die Ergebnisse der induzierten Proben wurden auf die unbehandelten Kontrollen normiert. (B) Der Nachweis der induzierten TBX2-Expression erfolgte im Western Blot (25 μ g Gesamtprotein) mittels anti-FLAG-Antikörper. Dox, Doxyzyklin. GLuc, Gaussia-Luciferase. kDa, Kilodalton. stab., stabil. trans., transient.

wurden stabil mit pTRE3G-TBX2 transfiziert. Die Resistenz gegen das Aminoglycosid-Antibiotikum Hygromycin B (Hyg B) erlangten die Zellen durch die Cotransfektion des Selektionsvektors pTK-Hyg. Dieser codiert für die *E. coli* Hygromycin-Phosphotransferase (hph), welche die Proteinbiosynthese durch Inhibierung der ribosomalen Translokation unterbindet.^[173] Um die genomische Integration der beiden Plasmide zu erleichtern, wurden diese vor der Transfektion linearisiert. Durch das Fehlen eines regulativen Enhancerelements in pTK-Hyg wird nach Angaben des Herstellers eine ungewollte pTRE-Aktivierung bei der Cointegration beider Vektoren in das zelluläre Genom vermieden. Die Bezeichnung der Klone entsprach der Ausgangszelllinie (#A1 bzw. #A6) und befolgte die Reihenfolge, in der die Klone auf 24 Well-Platten übertragen wurden. Der erste Klon wurde mit #A1.1 bzw. #A6.1 bezeichnet, der zweite Klon mit #A1.2 bzw. #A6.2 usw. Insgesamt wurden 92 COS-7/pEF1 α -Tet3G/pTRE3G-TBX2-Klone isoliert, davon 34 Klone von der Transfektion der Zelllinie #A1 und 58 Klone von der Transfektion der Zelllinie #A6. Von den 92 selektierten COS-7/pEF1 α -Tet3G/pTRE3G-TBX2-Klonen konnten letztendlich 33 Klone expandiert und auf ihre Dox-induzierbare TBX2-Expression überprüft werden. Um die Klone schnell und effektiv auf ihre TBX2-Expression hin überprüfen zu können, wurden im in Abb. 6.29 gezeigten Western Blot-Screening nur die induzierten Proben verwendet. Der Nachweis des in den Klonen nach Dox-Zugabe exprimierten

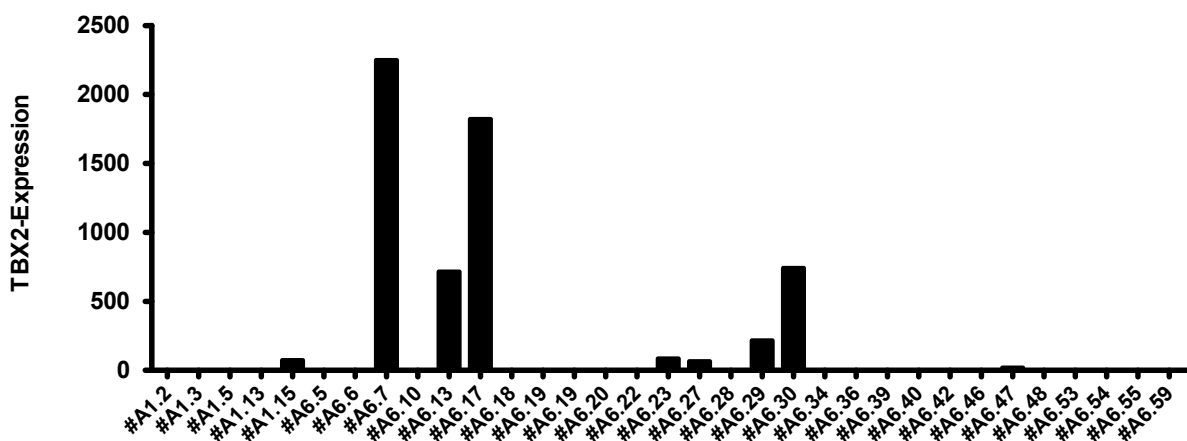


Abbildung 6.29: Der Expressionsnachweis von Dox-induziertem TBX2-Protein in doppelt stabilen COS-7/pEF1 α -Tet3G/pTRE3G-TBX2-Klonen. Konfluente COS-7/pEF1 α -Tet3G/pTRE3G-TBX2-Klone wurden in gleichen Teilen auf zwei Wells einer 12 Well-Platte verteilt. Ein Well diente als Erhaltungskultur. Das andere Well wurde 4 h später mit Dox induziert. 48 h nach der Induktion wurden die Zellysate hergestellt. Im Western Blot erfolgte die Detektion von TBX2 mittels anti-FLAG-Antikörper und Tubulin mittels anti-Tubulin-Antikörper. Gezeigt ist die Pixeldichteanalyse des induzierten TBX2-Proteins normiert auf die Tubulin-Kontrolle.

TBX2-Proteins erfolgte mittels FLAG-Immunodetektion. Hier wurde bei 8 von 33 Klonen TBX2-Protein nachgewiesen, wobei die Stärke der Bande von Klon zu Klon variierte. Um Unterschiede in der Proteinkonzentration beurteilen zu können, wurde zusätzlich Tubulin immunodetektiert.

Um die COS-7/pEF1 α -Tet3G/pTRE3G-TBX2-Klone schnell und effizient überprüfen zu können, wurden im vorangegangenen Screening nur die Dox-induzierten Lysate auf ihre stabile induzierbare TBX2-Expression im Western Blot getestet (siehe Abb. 6.29). Deswegen sollten in einem weiteren Experiment die Lysate der uninduzierten Kontrollen der 8 bereits TBX2-positiv getesteten COS-7/pEF1 α -Tet3G/pTRE3G-TBX2-Klone dahingehend überprüft werden, ob die TBX2-Expression auch wirklich induziert wurde. Ein Nachweis von TBX2-Protein in den nicht mit Dox behandelten Zellen würde auf eine Tet-On 3G unabhängige Aktivierung des TRE3G-Promotors hinweisen. Der Nachweis des Dox-induzierten TBX2-Proteins erfolgte im Western Blot mittels spezifischen FLAG-Antikörper. Zur Überprüfung des Gesamtproteins wurde Tubulin mittels spezifischem Antikörper nachgewiesen. Die induzierten Klone zeigten analog zu Abb. 6.29 unterschiedliche TBX2-Expressionslevels (siehe Abb. 6.30), wobei #A6.7, #A6.13 und #A6.17 am meisten TBX2-Protein exprimierten. Deutlich geringer war die TBX2-Expression der Klone #A1.15, #A6.23 und #A6.29. Bei den Klonen #A6.27 und #A6.30 war keine TBX2-Expression mehr detektierbar. Ebenso waren alle Lysate der uninduzierten Kontrollen TBX2-negativ, so dass nicht von einer basalen Aktivität des pTRE3G-Promotors auszugehen war. Dies belegt, dass erst

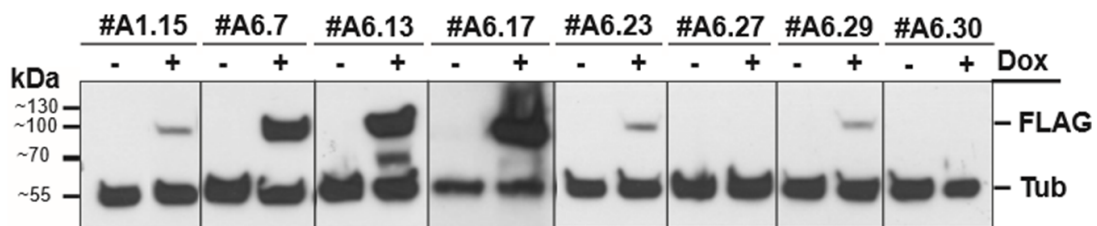


Abbildung 6.30: Rescreening der positiv auf induziertes TBX2-Protein getesteten COS-7/pEF1 α -Tet3G/pTRE3G-TBX2-Klone. Um die COS-7/pEF1 α -Tet3G/pTRE3G-TBX2-Klone auf ihre induzierte TBX2-Expression zu überprüfen, wurden konfluente Klone aus 6 Well-Platten geerntet und zu gleichen Teilen auf drei Wells einer 12 Well-Platten verteilt. Ein Well diente als Erhaltungskultur und bei den anderen beiden Wells wurde 24 h später das Medium gegen das Induktionsmedium (400 ng/ml Dox bzw. 0 ng/ml Dox) substituiert. 48 h nach Dox-Induktion wurden die Zelllysate hergestellt. Es wurden 20 μ g Gesamtprotein in einem 8 %-igen SDS-PAGE separiert. Anschließend erfolgte die Analyse von 3xFLAG markiertem TBX2-Protein mittels anti-FLAG-Antikörper sowie von Tubulin mittels anti-Tubulin (Tub)-Antikörper im Western Blot.

durch die Dox-Zugabe die TBX2-Expression induziert wurde.

6.4.6 Schritt 3: Integration einer TBX2-regulierten Expression von p21-d2EGFP

Die für das Screeningsystem zu etablierende stabile Zelllinie sollte neben TBX2 auch das Reportergen d2EGFP exprimieren. Da die p21-Promotorsequenz des Ligationsvektors p21-d2EGFP (siehe Kap. 6.1.6) fehlerfrei war, sollte nun die Expression des vom p21-Promotor regulierten d2EGFP-Reportergens überprüft werden. Zusätzlich sollte die Abhängigkeit der d2EGFP-Expression durch die TBX2-abhängige p21-Repression untersucht werden.

Um zu zeigen, dass die d2EGFP-Expression nach Coexpression von TBX2 sinkt, wurden COS-7 transient mit p21-d2EGFP und den Vektoren pT-REx/GW-30/lacZ (Kontrolle), TBX2-3xFLAG/pT-REx-DEST30 (TBX2) und TBX2dm-3xFLAG/pT-REx-DEST30 (TBX2dm) cotransfiziert. TBX2dm kann aufgrund der innerhalb der T-box-Bindedomäne lokalisierten Mutation GR121/122AS nicht an DNA binden.^[30] Folglich sollte die Expression von TBX2dm keinen Einfluss auf die p21-regulierte d2EGFP-Expression haben.

Die d2EGFP-Expression sowie die TBX2- und TBX2dm-Expression wurden im Western Blot quantifiziert, wobei die Bindung des FLAG-Antikörpers an die C-terminale FLAG-Sequenz von TBX2dm durch die Mutation nicht beeinflusst wurde. Mittels FLAG-Immunodetektion wurden sowohl nach TBX2- als auch nach TBX2dm-Transfektion zwei deutlich positive Banden nachgewiesen (siehe Abb. 6.31). Bei 100 kDa wurde die für TBX2 und TBX2dm erwartete Bande detektiert. Bei der 70 kDa Bande handelte es sich um Abbauprodukte des TBX2- und TBX2dm-Proteins. Bei der Kontrolle und der TBX2dm coexprimierenden Probe wurde mittels GFP-Antikörper bei ca. 35 kb eine schwach d2EGFP-positive Bande nachgewiesen. TBX2 coexprimierende Zellen waren d2EGFP-negativ (siehe Abb. 6.31). Dies zeigt, dass das p21-regulierte Reportergen d2EGFP in COS-7-Zellen exprimiert wurde und coexprimiertes TBX2 durch Repression des p21-Promotors die d2EGFP-Expression inhibierte. Die DNA-Bindemutante TBX2dm hatte wie erwartet keinen Einfluss auf die d2EGFP-Expression. Um Protein-Unterschiede der einzelnen Proben auszuschließen, wurde als Kontrolle Tubulin mittels Tubulin-Antikörper nachgewiesen. Zwar sind die detektierten Tubulin-Banden sehr schwach, sie zeigen aber, dass die aufgetragene Menge an Gesamtprotein identisch ist. Die geringe Intensität der GFP-positiven Banden

lässt darauf schließen, dass die Zellen nur eine geringe Konzentration an d2EGFP-Protein enthalten.

6.4.6.1 Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels

Luciferase-Reportergenassay

Zwar konnte nach transients Transfektion von p21-d2EGFP im Western Blot d2EGFP-Protein nachgewiesen werden (siehe Abb. 6.31), jedoch waren die detektierten Banden nur schwach positiv. Die geringe Bandenintensität zeigte, dass nur eine geringe Menge an d2EGFP-Protein in der Zelle vorhanden war. Da d2EGFP-Protein aufgrund einer Halbwertszeit von 2 h einem hohen Protein-Turn-over unterliegt, ist eine optimale Expressionsrate von d2EGFP zur Detektion im fluoreszenzbasierten Reporterassay von großer Wichtigkeit. Daher sollte die Transfektionseffizienz im Luciferase-Reportergenassay überprüft und gegebenenfalls optimiert werden.

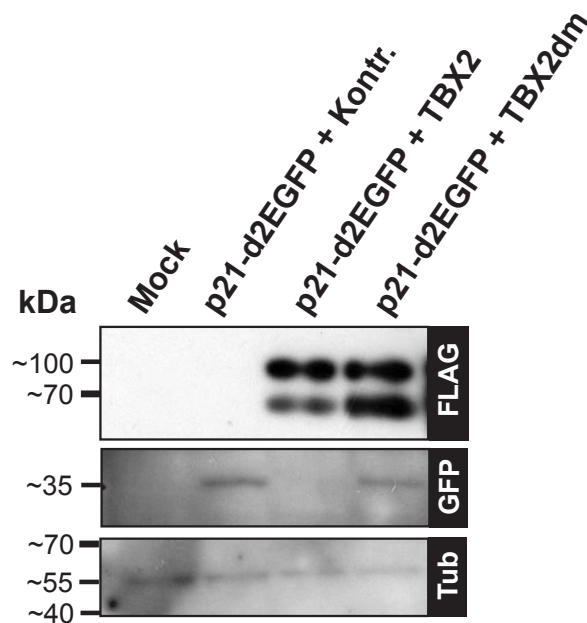


Abbildung 6.31: TBX2-regulierte p21-d2EGFP-Expression. COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden mit dem Reporter p21-d2EGFP ($0,5 \mu\text{g/ml}$) sowie den Expressionskonstrukten pT-REx/GW-30/lacZ ($0,5 \mu\text{g/ml}$) bzw. TBX2-3xFLAG/pT-REx-DEST30 (TBX2, $0,5 \mu\text{g/ml}$) oder TBX2dm-3xFLAG/pT-REx-DEST30 (TBX2dm, $0,5 \mu\text{g/ml}$) mittels FuGENE HD ($3 \mu\text{l/ml}$) cotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert. $10 \mu\text{g}$ Gesamtprotein wurden in einem 10 %-igen SDS-PAGE separiert. Die Analyse der Proteine erfolgte mittels Western Blot und anschließender Immundetektion. 3x-FLAG markiertes TBX2-Protein wurde mittels anti-FLAG-Antikörper und d2EGFP wurde mittels anti-GFP Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle wurde anti-Tubulin (Tub)-Antikörper verwendet. Mock, untransfizierte Zellen. kDa, Kilodalton. GFP, Grün Fluoreszierendes Protein.

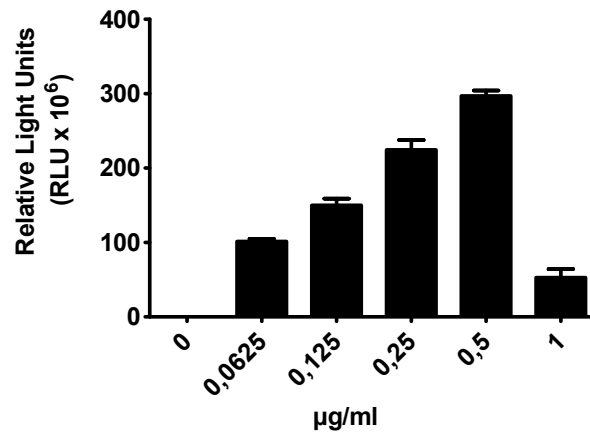


Abbildung 6.32: Überprüfung der Transfektionseffizienz. COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden mit den gezeigten Konzentrationen des Plasmids pGL3-Control mittels FuGENE HD ($3 \mu\text{l/ml}$) transfiziert und für 48 h inkubiert. Nach der Lyse wurde die FLuc-Aktivität gemessen. Gezeigt ist ein Versuch gemessen in Triplikaten plus SD.

Zu diesem Zweck wurden COS-7-Zellen mit den in Abb. 6.32 gezeigten Konzentrationen mit pGL3-Control-Vektor (FLuc) transfiziert. Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transfektion gemessen. Abb. 6.32 zeigt, dass bei allen transfizierten pGL3-Kontroll-Konzentrationen ein hoher RLU-Wert gemessen wurde, der die FLuc-Aktivität widerspiegelte. Der niedrigste RLU-Wert wurde bei einer Transfektionsbedingung von $1 \mu\text{g/ml}$ Plasmid-DNA bei $3 \mu\text{l/ml}$ FuGENE HD gemessen. Da es sich hierbei um die bisherige Standardtransfektionsbedingung handelt, resultierte die geringe GFP-Bandenintensität des Western Blots (siehe Abb. 6.31) wahrscheinlich aus einer schwachen d2EGFP-Expressionsrate infolge einer geringen Transfektionseffizienz in Kombination mit einer schnellen Abbaurrate des gebildeten d2EGFP-Proteins. Aufgrund des gemessenen RLU-Höchstwerts bei einer Transfektionsbedingung von $0,5 \mu\text{g/ml}$ Gesamt-DNA bei $3 \mu\text{l/ml}$ FuGENE HD wurde diese Bedingung für die nachfolgenden Experimente als Standardtransfektionsbedingung festgelegt.

6.4.6.2 Die TBX2-regulierte p21-d2EGFP-Expression im FACS

Zur schnellen und einfachen Messung sollte die TBX2- und TBX3-abhängige p21-d2EGFP-Expression nach transients Transfektion mittels der sensitiven Durchflusszytometrie (FACS) überprüft werden. Hierbei sollte gezeigt werden, dass die Coexpression von TBX2 und TBX3 im Vergleich zur Kontrolle zu einer verminderten d2EGFP-Expression führte. Entsprechend sollte die Coexpression der beiden DNA-Bindemutanten TBX2dm und

TBX3dm die p21-Aktivität nicht beeinflussen und die d2EGFP-Expression vergleichbar mit der Kontrolle sein.

Zu diesem Zweck wurden COS-7-Zellen unter den in Kap. 6.4.6.1 optimierten Transfektionsbedingungen mittels FuGENE HD jeweils mit p21-d2EGFP und den für die gezeigten TBX-Konstrukte codierenden Vektoren sowie der Kontrolle cotransfiziert. Um die Expressionsrate von d2EGFP mit der eines stabilen GFPs vergleichen zu können, wurde zusätzlich die Cotransfektion von pmaxGFP und pT-REx/GW-30/lacZ durchgeführt. pmaxGFP codiert für das stabile aus dem Cocepoden *Pontellina plumata* isolierte und modifizierte maxGFP.

Abb. 6.33 A zeigt, dass die Anzahl an maxGFP positiven Zellen in der gemessenen Zellpopulation deutlich höher war als die Anzahl an d2EGFP positiven Zellen in einer vergleichbaren Zellpopulation. Entsprechend höher war auch die gemessene durchschnittliche Intensität der Leuchtkraft (MFI, engl.: mean of fluorescent intensity) der maxGFP positiven Zellen (siehe Abb. 6.33 B). Bei der Überprüfung der TBX2 und der TBX3-regulierten p21-Expression wurde bei den d2EGFP und TBX2dm bzw. TBX3dm coexprimierenden Zellen ein etwas höherer Anteil an d2EGFP-positiven Zellen detektiert als nach Coexpression von TBX2 und TBX3 (siehe Abb. 6.33 A). Dies war zu erwarten, da das wildtypische TBX2 und TBX3

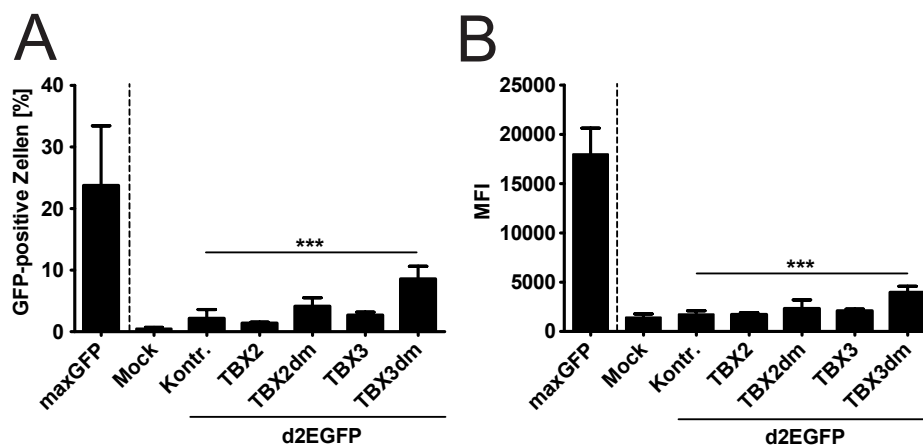


Abbildung 6.33: Überprüfung der TBX2-regulierten p21-d2EGFP-Expression im FACS.

COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden mittels FuGENE HD (3 μ l/ml) mit dem Reporterkonstrukt 0,25 μ g/ml p21-d2EGFP (d2EGFP) und jeweils 0,25 μ g/ml der für die gezeigten TBX-Konstrukte codierenden Expressionsvektoren bzw. pT-REx/GW-30/lacZ (Kontr.) cotransfiziert. Als Kontrolle wurden 0,25 μ g/ml pT-REx/GW-30/lacZ und 0,25 μ g/ml pmaxGFP (maxGFP) cotransfiziert. Die Fixierung der Zellen erfolgte 48 h nach der Transfektion. Gezeigt sind der prozentuale Anteil an GFP-positiven Zellen (A) und die MFI-Werte der Zellpopulation (B). Signifikante Unterschiede wurden mittels one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest relativ zur Kontrolle berechnet. Mock, untransfizierte Zellen. MFI, mean of fluorescent intensity.

im Gegensatz zu den DNA-Bindemutanten TBX2dm und TBX3dm den p21-Promotor reprimierten. Unerwartet niedrig war die Anzahl an d2EGFP-positiven Zellen bei der Kontrolle. Hier wäre ein d2EGFP-Anteil entsprechend TBX2dm und TBX3dm zu erwarten gewesen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen unbehandelten Zellen und der Kontrolle (siehe Abb. 6.33 A). Der MFI-Wert war ebenfalls bei den transient d2EGFP-exprimierenden Zellen kaum über dem Hintergrund der untransfizierten Zellen (Mock) detektierbar, mit der Ausnahme von TBX3dm (siehe Abb. 6.33 B).

Das Ergebnis zeigt, dass in der Zelle mehr stabiles maxGFP angereichert wurde. Aufgrund der Halbwertszeit von 2 h unterliegt d2EGFP einem raschen zellulären Abbau, was die Detektionsschwelle für d2EGFP deutlich erhöht. Ein zusätzliches Problem waren die schwankenden d2EGFP-Levels. Daher konnte trotz der höheren Sensitivität der FACS-Messung gegenüber zellulärer Fluoreszenz kein aussagekräftiges Ergebnis zur Untersuchung der TBX2-regulierten p21-Expression mit d2EGFP als Reporter gen erhalten werden.

6.4.6.3 Test der Transfektionseffizienz durch Vergleich der Fluoreszenzsignalintensitäten von d2EGFP und maxGFP

Trotz einer optimierten Transfektionsbedingung konnte im FACS kein signifikanter Unterschied zwischen der Fluoreszenzintensität des exprimierten d2EGFP-Proteins und dem Hintergrundsignal der unbehandelten COS-7 detektiert werden (siehe Abb. 6.33). Die gemessene Fluoreszenzintensität der d2EGFP-exprimierenden Zellen war zudem deutlich schwächer als die des stabilen maxGFP. Aus diesem Grund sollte nun die Transfektionseffizienz erneut über den direkten Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von exprimiertem d2EGFP und maxGFP überprüft werden. Hierzu wurden COS-7-Zellen mit den in Abb. 6.34 gezeigten Konzentrationen von p21-d2EGFP bzw. pmaxGFP mittels FuGENE HD transfiziert. Die Messung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte photometrisch am TECAN-Reader.

Die Messung der maxGFP-Intensität (siehe Abb. 6.34) zeigte bei einer Transfektionsbedingung von 0,5 µg/ml sowie 1 µg/ml Plasmid-DNA und jeweils 3 µl/ml FuGENE HD die stärkste Emission und damit die höchste Transfektionseffizienz. Dies bestätigte das Ergebnis der vorherigen Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels Luciferase-Reporter genassay (siehe Abb. 6.32), wo nach transienter Transfektion von 0,5 µg/ml Plasmid-DNA und 3 µl/ml FuGENE HD der höchste RLU-Wert erzielt werden konnte. Dagegen konnte

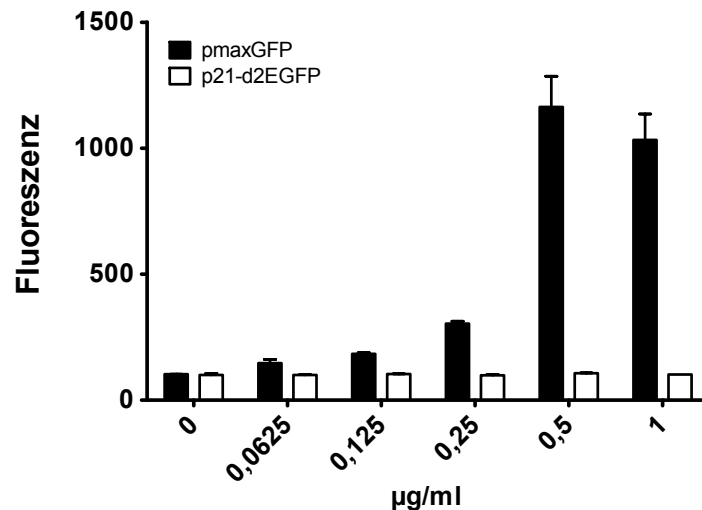


Abbildung 6.34: Überprüfung der Transfektionseffizienz durch Vergleich der Intensitäten der Fluoreszenzsignale von d2EGFP und pmaxGFP. COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden mit den gezeigten Konzentrationen von pmaxGFP und p21-d2EGFP mittels FuGENE HD ($3 \mu\text{l/ml}$) transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Messung der Fluoreszenzintensität am TECAN-Reader. Gezeigt ist ein Versuch gemessen in Duplikaten plus SD.

keine d2EGFP-Fluoreszenz über dem Hintergrundsignal ($0 \mu\text{g/ml}$) detektiert werden. Das Ergebnis bestätigt, dass der schnelle Abbau und die daraus resultierende geringe zelluläre Konzentration die Detektion von d2EGFP erschwerte. Aufgrund der hohen Detektionsschwelle von d2EGFP war der TECAN-Reader nicht die geeignete Messmethode für die d2EGFP-Emission.

6.4.6.4 Überprüfung der p21-regulierten d2EGFP-Expression an der Cellomics Arrayscan VTI Plattform

Die digitale Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht die exakte Analyse und Quantifizierung der Fluoreszenzaktivität tausender von Zellen in Mikrotiterplatten. Um eine Aussage über die Qualität des zu entwickelnden zellulären Screeningsystems unter realen Testbedingungen machen zu können, sollte nun die Detektion der p21-Regulierten d2EGFP-Expression am Cellomics Arrayscan[®] VTI HCS Reader (Thermo Scientific) im Mainz Screening Center untersucht werden. Zusätzlich sollte die Emission von d2EGFP mit der von maxGFP verglichen werden.

Die DNA der in schwarzen 96 Well-Platten mit durchsichtigem Boden transient transfizierten COS-7 wurde unmittelbar vor der Messung wie in Fetzi *et al.*^[174] beschrieben durch 30 min Inkubation mit dem Farbstoff Hoechst 33342 gefärbt. Da die Messung am

Cellomics Arrayscan VTI HCS Reader eine genaue Determinierung der Messparameter wie Kerngröße, Form des Kerns, Zellgröße und Form der Zelle erforderte, wurden in zwei verschiedenen Kanälen sog. Masken erstellt. Diese wurden mit der Hilfe von V. Fetz der AG Stauber (Universitätsmedizin Mainz), wie in Fetz *et al.*^[174] beschrieben, angelegt (siehe Abb. 6.35). Die Messung der gesamten Platte erfolgte zunächst mit einer kurzen Expositionszeit von 0,09s. Aufgrund der hohen Detektionsschwelle von d2EGFP wurde die Messung mit einer längeren Expositionszeit von 3,22s wiederholt.

Abb. 6.36 A zeigt die fluoreszenzmikroskopische Dokumentation der transienten GFP-Expression transfizierter Zellen (Kontrolle/p21-d2EGFP/GFP) in zwei unterschiedlichen Expositionszeiten (0,09s und 3,22s). Gezeigt wurden repräsentative Wells der in Abb. 6.36 B gemittelten Daten. Nur bei einer Expositionszeit von 3,22s war eine signifikante maxGFP-Expression detektierbar (siehe Abb. 6.36 A und B). Bei der Datenauswertung wurde kein Unterschied zwischen der Fluoreszenzmessung bei niedriger und hoher Expositionszeit festgestellt. Die d2EGFP-Expression blieb auch nach Erhöhung der Expositionszeit unterhalb der Detektionsgrenze des Cellomics Arrayscan[®] VTI HCS Readers. So wurde bei der Überprüfung der TBX2-regulierten p21-Expression kein d2EGFP-Signal über dem Hintergrund (Mock) detektiert. Dagegen konnte ein deutliches maxGFP-Signal detektiert werden. Entsprechend konnte bei allen in Abb. 6.36 C gezeigten Konzentrationen eine maxGFP-Emission gemessen werden, mit einem Höchstwert bei 0,5 µg/ml Plasmid-DNA. Dagegen konnte keine signifikante d2EGFP-Emission über dem Hintergrundsignal

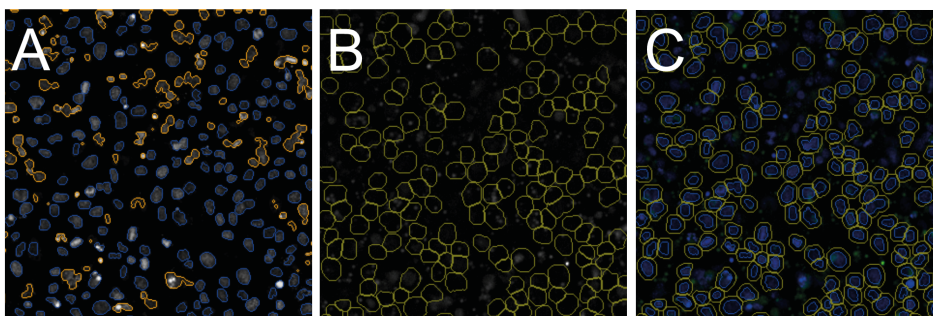


Abbildung 6.35: Determinierung der Masken zur Messung am Cellomics Arrayscan VTI HCS Reader. COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden transient in schwarzen 96 Well-Platten mit durchsichtigem Boden transfiziert. Die Zellkerne von Interphase-Zellen wurden vor der Messung am Cellomics Arrayscan VTI HCS Reader mit Hoechst 33342 gefärbt. (A) Dargestellt ist die Maske im Kanal 1 zur Determinierung der Parameter eines zu messenden Zellkerns (blau). Die orange Markierung zeigt von den gewählten Parametern abweichende und bei der Messung nicht berücksichtigte Zellkerne. (B) Dargestellt ist die Maske im Kanal 2 zur Determinierung der Parameter für Zellgröße/-form. (C) Zeigt den Overlay der Masken für Kanal 1 und Kanal 2.

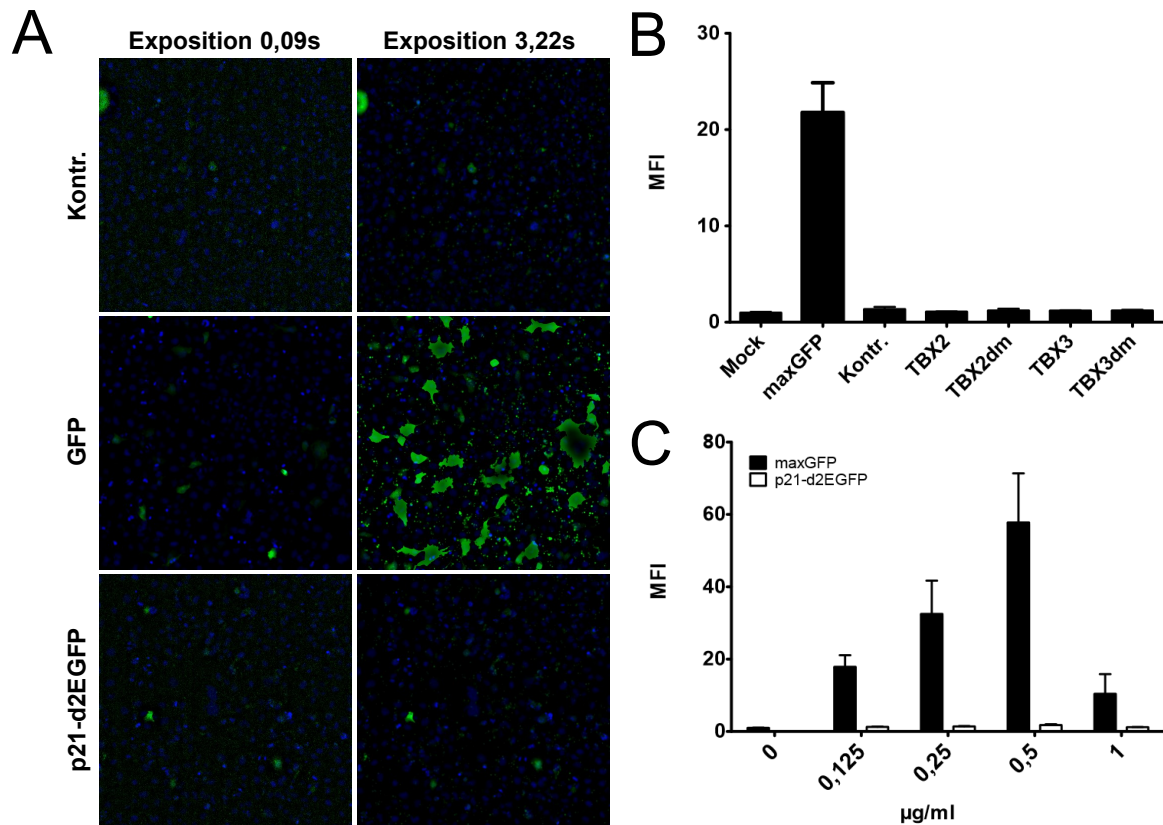


Abbildung 6.36: Messung der Fluoreszenz von d2EGFP und maxGFP mittels Cellomics Arrayscan VTI HCS Reader. (A, B) COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden transient mit dem p21-d2EGFP-Reporter (0,25 µg/ml) sowie jeweils 0,25 µg/ml der für die gezeigten TBX-Proteine codierenden Konstrukte bzw. pT-REx/GW-30/lacZ (Kontr.) mittels FuGENE HD (3 µl/ml) cotransfiziert. 48 h nach der Transfektion in einer schwarzen 96 Well-Platte mit durchsichtigem Boden wurden die Zellkerne von Interphase-Zellen mit Hoechst 33342 gefärbt. Nach Determination der Messparameter entsprechend Abb. 6.35 wurden pro Well 500 Zellen am Cellomics Arrayscan VTI HCS Reader gemessen. (A) Gezeigt sind die Aufnahmen je eines ausgewählten Wells der in (B) gezeigten Messung. (B) Dargestellt ist die Überprüfung der TBX2-regulierten p21-Expression. Gezeigt ist ein Versuch gemessen in Triplikaten plus SD. (C) COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden transient mit den Reportern p21-d2EGFP bzw. pmaxGFP in den gezeigten Konzentrationen mittels FuGENE HD (3 µl/ml) cotransfiziert. Dargestellt ist die Emission von d2EGFP vs. Emission von maxGFP eines Versuchs gemessen in Triplikaten plus SD. MFI, Mean of Fluorescent Intensity.

detektiert werden.

Das Ergebnis zeigt, dass die Detektion von d2EGFP am Cellomics Arrayscan VTI HCS Readers nicht möglich war. Wahrscheinlich war die Detektionsschwelle zu hoch, da aufgrund des hohen Turn-overs pro Zelle nur eine geringe Menge an d2EGFP-Protein angereichert wurde.

6.4.6.5 Transfektionseffizienz: Der Einfluss der Cotransfektion auf die Reporterexpression

Die bisherigen Ergebnisse der transienten p21-d2EGFP-Expression von Kap. 6.4.6.1 bis Kap. 6.4.6.4 zeigten, dass vermutlich aufgrund des hohen Turn-overs nur geringe Mengen an d2EGFP-Protein in der Zelle angereichert werden konnten. Dies erschwerte die Detektion von d2EGFP-Protein mittels Western Blot (siehe Abb. 6.31), FACS (siehe Abb. 6.33) und TECAN-Reader (siehe Abb. 6.34). Aufgrund der starken Schwankungen in der d2EGFP-Expressionsrate, insbesondere nach Cotransfektion eines zusätzlichen Vektorkonstrukts, sollte durch Bestimmung der Transfektionseffizienz nach transienter Transfektion von p21-FLuc bzw. p21-FLuc/Kontr. (1:1)-Cotransfektion der Einfluss der Cotransfektion auf die Reporterexpression überprüft werden.

Abb. 6.37 zeigt, dass für alle transfizierten p21-FLuc-Konzentrationen und p21-FLuc/pT-REx/GW-30/lacZ-Konzentrationen eine FLuc-Aktivität gemessen wurde. Diese war jeweils bei einer Plasmidkonzentration von 0,5 µg/ml am höchsten. Nach der alleinigen Transfektion von p21-FLuc wurden insgesamt höhere RLU-Werte gemessen, als nach der Cotransfektion von p21-FLuc mit pT-REx/GW-30/lacZ. Dies war zu erwarten, da sich die Konzentration auf die Gesamtkonzentration bezog und folglich nach Cotransfektion von zwei Vektoren

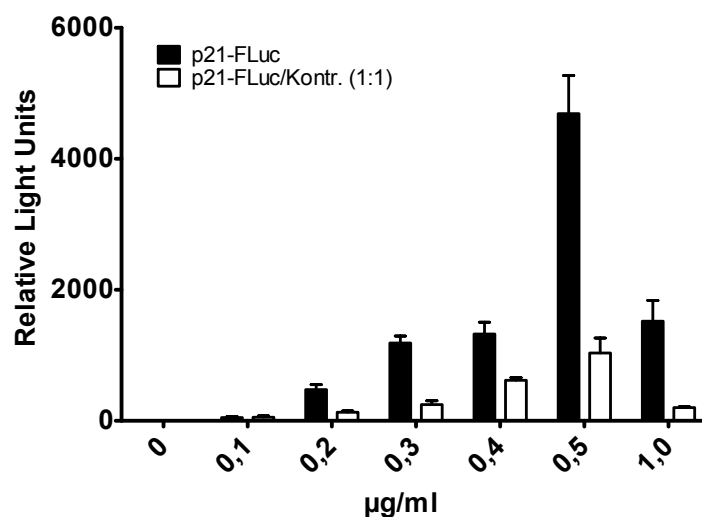


Abbildung 6.37: Einfluss der Cotransfektion von Vektoren auf die Genexpression. COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden mit den gezeigten Konzentrationen der Reporterkonstrukte p21-FLuc bzw. p21-FLuc und pT-REx/GW-30/lacZ (Kontr.) mittels FuGENE HD ($3 \mu\text{l/ml}$) transfiziert und für 48 h inkubiert. Die Plasmid-Gesamtkonzentration ($1 \mu\text{g/ml}$) wurde mit pT-REx/GW-30/lacZ aufgefüllt. Nach der Lyse erfolgte die Messung der FLuc-Aktivität. Gezeigt ist ein Versuch gemessen in Triplikaten plus SD.

bei 0,5 µg/ml, pro Konstrukt jeweils nur 0,25 µg/ml DNA transfiziert wurden. Da die RLU-Werte bei 0,5 µg/ml p21-FLuc/pT-REx/GW-30/lacZ den bei 0,25 µg/ml p21-FLuc entsprach, ist hier ein negativer Effekt durch die Cotransfektion auszuschließen. Dagegen stimmt die RLU-Werte bei 1,0 µg/ml p21-FLuc/pT-REx/GW-30/lacZ nicht mit denen von 0,5 µg/ml p21-FLuc überein. Der drastische Einbruch in der p21-FLuc-Expression bei 1,0 µg/ml zeigt, dass größere Mengen an transfizierter DNA nicht unweigerlich zu einer stärkeren Proteinexpression führen.

Das Ergebnis zeigt, dass ein negativer Effekt durch die Cotransfektion auszuschließen ist.

6.4.6.6 Untersuchung der p21-Expression nach TBX2-Induktion

Die Menge des Reportergens beeinflusst den Read-out des Reportersystems. Im transienten System war die Detektion von d2EGFP schwierig. Davon ausgehend, dass im stabilen System nun alle Zellen d2EGFP gleichermaßen exprimieren würden, sollte im stabilen System ein deutlich besseres Read-out erhalten werden. Zur Generierung der dreifach stabilen Zelllinie sollte nun aus den drei COS-7/pEF1 α -Tet3G/pTRE3G-TBX2-Klonen (#A6.7, #A6.13 und #A6.17) mit der höchsten induzierten TBX2-Expressionsrate (siehe Abb. 6.30) ein Klon ausgewählt werden.

Zu diesem Zweck sollte die TBX2-regulierte p21-Expression im Reporterassay erneut überprüft werden. Zum einen wurde analog zu Kap. 6.4.4 nach transienter Transfektion ein p21-GLuc-Reporterassay durchgeführt. Zur Normalisierung der RLU-Werte wurde zusätzlich der für die FLuc codierende pGL3-Kontroll-Vektor cotransfiziert. Als Kontrolle wurden COS-7 transient mit den Konstrukten pEF1 α -Tet3G, pTRE3G-TBX2 und p21-GLuc/pGL3-Kontroll sowie die Zelllinie #A6 mit den Konstrukten pTRE3G-TBX2 und p21-GLuc/pGL3-Control transfiziert.

Zum anderen wurde die TBX2-regulierte p21-Expression im FACS überprüft. Hier wurde davon ausgegangen, dass die drei nur mit p21-d2EGFP transient transfizierten Klone ein gut detektierbares d2EGFP-Read-out zeigen würden. Zusätzlich wurde als Kontrolle COS-7 mit p21-d2EGFP, pEF1 α -Tet3G und pTRE3G-TBX2 und #A6 mit den Konstrukten pTRE3G-TBX2 und p21-d2EGFP cotransfiziert. Die Dox-Induktion erfolgte jeweils 24 h nach der Transfektion. 48 h nach der Induktion wurde die Luciferase-Aktivität bzw. d2EGFP-Aktivität gemessen. Um einen Vergleich der transient transfizierten Zelllinien zu gewährleisten, erfolgte eine Normierung der gemessenen Werte auf die uninduzierte

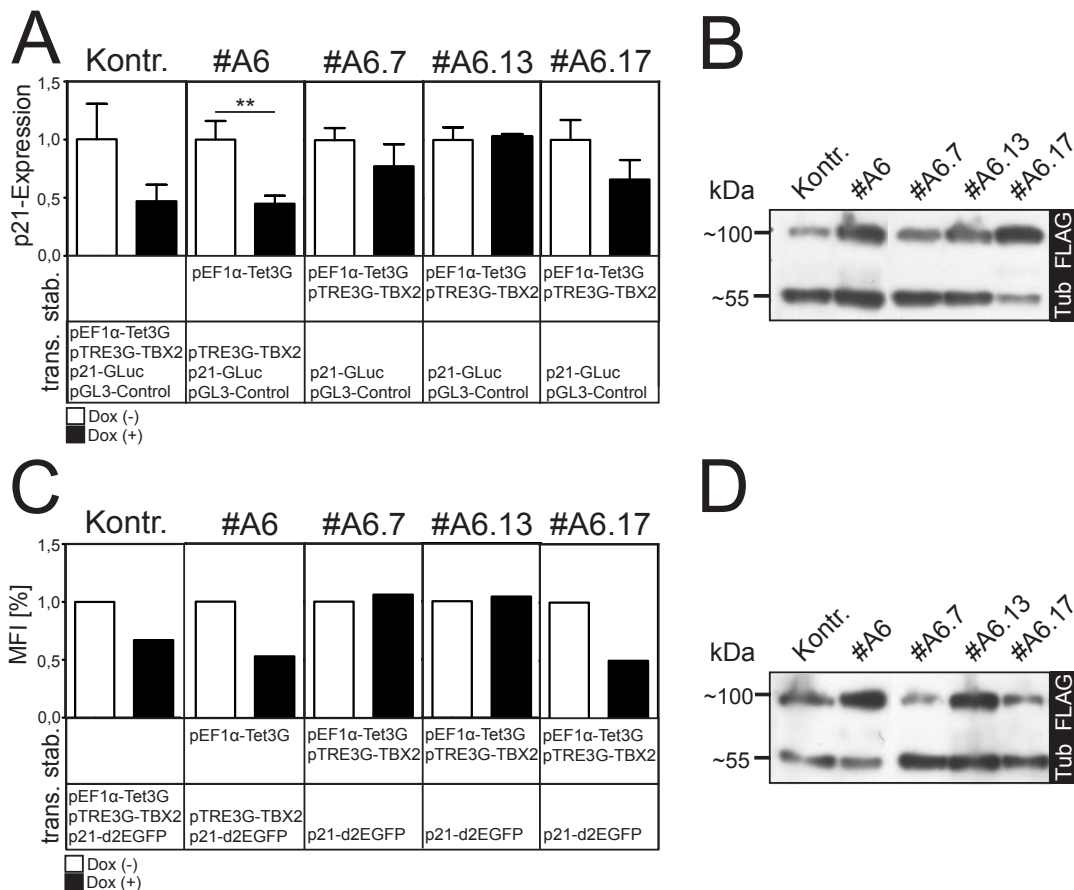


Abbildung 6.38: Untersuchung der p21-Expression von COS-7/pEF1α-Tet3G/pTRE3G-Zelllinien nach TBX2-Induktion. COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden in 6 Well-Platten mit pEF1α-Tet3G (0,166 µg/ml), pTRE3G-TBX2 (0,166 µg/ml) und p21-GLuc/pGL3-Control (10:1; 0,166 µg/ml) bzw. p21-d2EGFP (0,166 µg/ml) cotransfiziert. #A6 (COS-7/pEF1α-Tet3G, 10^5 /ml) wurde mit pTRE3G-TBX2 (0,25 µg/ml) und p21-GLuc/pGL3-Control (10:1; 0,25 µg/ml) bzw. p21-d2EGFP (0,25 µg/ml) cotransfiziert. #A6.7/13/17 (COS-7/pEF1α-Tet3G/pTRE3G-TBX2, 10^5 /ml) wurden mit p21-GLuc/pGL3-Control (10:1; 0,5 µg/ml) bzw. p21-d2EGFP (0,5 µg/ml) cotransfiziert. Nach 5 h 30 min wurden die transfizierten Zellen auf zwei Wells einer 12 Well-Platte gesplittet. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Induktion mit 400 ng/ml bzw. 0 ng/ml Dox. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert. (A) Gezeigt ist ein Luciferase-Assay gemessen in Triplikaten plus SD. Die RLU-Werte der induzierten Probe wurden auf die entsprechende unbehandelte Kontrolle normiert. (C) Gezeigt ist die durchschnittliche Leuchtkraft (MFI) gemessen im FACS. Die Werte der induzierten Probe wurden relativ zur entsprechenden unbehandelten Kontrolle aufgetragen. (B, D) Der TBX2-Nachweis der im Luciferase-Assay getesteten Proben (B) und der im FACS getesteten Proben (D) erfolgte mittels Western Blot. Es wurden 10 µg Gesamtprotein in einem 8 %-igen SDS-PAGE separiert und geblottet. Anschließend erfolgte die Analyse von 3xFLAG markiertem TBX2-Protein mittels anti-FLAG-Antikörper sowie von Tubulin (Tub) mittels anti-Tubulin-Antikörper. Dox, Doxyzyklin. kDa, Kilodalton. ns, nicht signifikant. stab., stabil. trans., transient.

Kontrolle. Der Nachweis der induzierten TBX2-Expression erfolgte mittels spezifischem FLAG-Antikörper im Western Blot. Zusätzlich wurde Tubulin mittels spezifischem Antikörper nachgewiesen.

Das Ergebnis des Luciferase-Reporterassays (siehe Abb. 6.38 A) zeigte, dass bei den

Kontrollen COS-7 (Kontr.) und #A6 die p21-Aktivität nach Dox-Induktion wie erwartet auf ca. die Hälfte des für die unbehandelte Probe gemessenen Wertes sank. Bei den getesteten Klonen wurde nur für #A6.17 ein Rückgang der p21-Aktivität nach Induktion gemessen, welcher aber nicht signifikant war. #A6.7 zeigte einen minimalen Rückgang der p21-Aktivität nach Dox-Induktion. Bei #A6.13 wurde nach Dox-Induktion kein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle gemessen. Dagegen konnte für alle induzierten Ansätze im Western Blot TBX2-Protein nachgewiesen (siehe Abb. 6.38 B) werden.

Wie erwartet, war die Anzahl an GFP-positiven Zellen bei den mit p21-d2EGFP transfizierten, doppelt stabilen Zelllinien höher als bei den cotransfizierten Ansätzen. Wie in Abb. 6.38 C zu erkennen, bestätigt das Ergebnis der FACS-Messung das Ergebnis des in Abb. 6.38 A gezeigten Luciferase-Reportergenassays. Bei den Kontrollproben COS-7 (Kontr.) und #A6, sowie bei Klon #A6.17 wurde nach Dox-Induktion eine geringere Fluoreszenzintensität im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollprobe gemessen. Bei #A6.7 und #A6.13 wurde nach Dox-Induktion kein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle gemessen. Dagegen konnte für alle induzierten Ansätze im Western Blot TBX2-Protein nachgewiesen werden (siehe Abb. 6.38 D). Die zur Durchführung der Luciferase-Reportergenassays sowie zur FACS-Messung benötigten transienten Transfektionen wurden parallel jeweils in 6 Well-Platten durchgeführt. Da aufgrund der geringen Wachstumsrate insbesondere von #A6.17 insgesamt nicht genügend Zellen der klonalen Zelllinien zur Verfügung standen, wurde das Experiment nur einmal durchgeführt. Die Zellen wurden 5 h nach der Transfektion auf 12 Well-Platten verteilt. Zur Messung der Luciferase-Assays wurden zusätzlich 6 x 100 µl Zellsuspension auf einer weißen 96 Well-Platte verteilt. Daher konnte bei der Luciferase-Messung eine Standardabweichung bestimmt werden und bei der FACS-Messung nicht.

Obwohl alle getesteten Klone nach Dox-Induktion TBX2 exprimierten, wurde in diesem Experiment nur bei #A6.17 ein Rückgang der p21-Aktivität in beiden verwendeten Reportersystemen nachgewiesen. Entsprechend wurde Klon #A6.17 zur Generierung der dreifach stabilen Zelllinie ausgewählt.

6.4.6.7 Herstellung einer dreifach stabilen Tet-On-Zelllinie durch Transfektion der Zelllinie #A6.17 mit p21-d2EGFP

Da bei einer stabilen Zelllinie ein besseres Read-out des d2EGFP-Reporters erwartet wurde, sollte trotz der schlechten Prognose des transienten Systems im letzten Schritt das p21-regulierte Reportergen d2EGFP stabil in das Genom der doppelt stabilen Zelllinie COS-7/pEF1 α -Tet3G/pTRE3G-TBX2 integriert werden. Die Ausgangs-Zelllinie exprimierte konstitutiv das durch pEF1 α -Tet3G kodierte Tet-On 3G-Aktivatorprotein sowie TBX2 unter der Kontrolle des aktivierbaren TRE3G-Promotors. Als Zielzelllinie wurde #A6.17 (COS-7/pEF1 α -Tet3G/pTRE3G-TBX2) verwendet, da nur dieser Klon nach transienter Transfektion eine Inhibierung der p21-regulierten Reportergenaktivität infolge der Dox-induzierten TBX2-Expression zeigte (siehe Abb. 6.38 A, C). Somit wurde im letzten Schritt das p21-d2EGFP-konstrukt stabil in das Genom der Zelllinie #A6.17 integriert. Da dem p21-d2EGFP-Vektor ein Resistenzgen zur stabilen Selektion von Zellklonen fehlte, wurde der lineare Puromycin-Marker von Clontech cotransfiziert. Hierbei handelte es sich um ein kurzes DNA-Fragment, welches neben einem Resistenzgen den SV40-Promotor sowie das SV-Polyadenylierungssignal beinhaltet.

Trotz der Durchführung mehrerer Transfektionsansätze sowie dem Versuch der stabilen Selektion mit zwei unterschiedlichen Puromycinkonzentrationen von 0,5 μ g/ml und 1 μ g/ml überlebte kein Klon die Antibiotikaselektion. Innerhalb von zwei Wochen starben nahezu 99 % der Zellen, inklusive der GFP-positiven. Zellen, die länger überlebten, waren im Vergleich bis zu 5x größer als die durchschnittlichen Zellen der Wirtszelllinie #A6.17. Somit ist es im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen, eine dreifach stabile Zelllinie zu generieren.

7 Diskussion

7.1 Mutantanalyse

Analog zu ihrer Schlüsselrolle während der Entwicklung und Organogenese spielen TBX2/3 auch für die Karzinogenese eine wichtige Rolle. TBX2/3 sind an der Regulation des Zellzyklus beteiligt und werden in zahlreichen Krebsarten überexprimiert.^[27,51] So werden TBX2/3 während der normalen Entwicklung von Brustgewebe exprimiert und ein verändertes Expressionslevel wird mit der Pathogenese von Brustkrebs assoziiert.^[140] Hierbei wird TBX2 vorwiegend mit BRCA1/2-assoziierten Brustkrebs in Verbindung gebracht.^[56] Dagegen wird die Überexpression von TBX3 mit späten Brustkrebsstadien sowie Östrogenrezeptor-positiven Brusttumoren assoziiert.^[138]

Die Tumorgenese wird von zahlreichen Mutationen begleitet, wobei Treibermutationen direkt mit der Tumorprogression assoziiert werden.^[48] In Brustkrebs wurde *TBX3* als Treiber^[1] und als signifikant mutiertes Gen (SIM)^[77] identifiziert. Die Signifikanz von *TBX3*-Mutationen bei Brustkrebs wurde durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in silico*-Analyse der im The Cancer Genome Atlas (TCGA) gesammelten somatischen *TBX3*-Mutationen bestätigt (siehe Tab. 6.2).

7.1.1 Die Rolle konservierter Aminosäuren für die DNA-Bindefähigkeit

Die Analyse von *TBX3*-Mutationen ergab, dass 14 von 15 Frameshift-Mutationen im N-terminalen Bereich von *TBX3* lokalisiert waren, zehn davon sogar innerhalb der T-box-Domäne (siehe Abb. 6.17). Von acht im Datenset der BRCA-US-Studie identifizierten *TBX3*-Mutationen sind vier innerhalb der T-box-Domäne lokalisiert (L112F, W113R und H187Y [2x], siehe Anhang, Tab. 10.3). Die vier im Rahmen dieser Arbeit analysierten

potentiellen TBX3-Treiber Mutationen waren ebenso in der T-box-Domäne lokalisiert (siehe Abb. 6.7) und zeigten durch die Mutation eine eingeschränkte DNA-Bindung (siehe Abb. 6.9). Dies deutet darauf hin, dass während der Progression von Brustkrebs Mutationen selektiert werden, die einen Verlust der DNA-Bindung bewirken. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass T-box-Mutationen, die einen voll konservierten Aminosäurerest betreffenden, die DNA-Bindung stärker beeinflussen als in nicht-konservierten Bereichen auftretende Mutationen. Die Mutationen L112F, W113R und H187Y betreffen in allen 16 humanen TBX-Proteinen voll konservierte Aminosäurereste. Es konnte gezeigt werden, dass die DNA-Bindung durch die Mutation H187Y stark beeinträchtigt war (siehe Abb. 6.9). Eine dem Tryptophan-Rest W113 von TBX3 entsprechende Mutation wurde im TBX22 eines Patienten mit „X-linked cleft palate“-Syndrom identifiziert (W102) und das W102C-mutante TBX22-Protein konnte keine DNA binden.^[163]

Das BRCA-US-Datenset führt dreizehn Missense-Mutationen innerhalb der T-box-Domäne anderer *TBX*-Gene auf. Drei der Mutationen (23 %) betreffen vollständig konservierte Aminosäurereste, zwei Aminosäurereste (15 %) sind funktionell konserviert und acht betreffen nicht konservierte Aminosäurereste (62 %, gemessen an einem Alignment der menschlichen *TBX*-Paraloge). Dies korrespondiert mit der Verteilung der Konservierungskategorien (25 %, 21 % und 64 %). Die Anreicherung konservierter Aminosäurereste als Ziel für Missense-Mutationen in *TBX3* unterstützt die Idee der positiven Selektion des T-box-Funktionsverlusts von TBX3 im Verlauf der Brustkrebsprogression. Ebenso gab es einen Trend der Konservierung der N-terminalen Brustkrebsmutationen in TBX3. Ca. ein Viertel des N-Terminus der beiden orthologen Säugerproteine Tbx2 und Tbx3 sind stark konserviert und drei von vier N-terminalen TBX3-Mutationen betrafen einen solch konservierten Aminosäurerest.

7.1.2 Die DNA-Bindung der untersuchten potentiellen TBX3-Treibermutanten unter Betrachtung der Proteinstruktur

Coll *et al.* analysierten die Struktur der T-box-Domäne von TBX3 zusammen mit einer 20bp langen palindromischen DNA-Zielsequenz.^[8] Innerhalb dieser Struktur ist die Position N212 Teil einer DNA-Schleife, welche die beiden kurzen β -Stränge e und e' miteinander

verbindet. Die Länge dieser Schleife variiert zwischen den verschiedenen Tbx-Proteinen. Wie in Tab. 6.1 gezeigt, enthält die Proteinsequenz der Mitglieder der Tbr1-Unterfamilie (TBR1, TBX21 und EOMES)^[15] eine drei Aminosäuren umfassende Insertion, welche ebenso Teil des TBX3-orthologen *Drosophila*-Proteins Omb ist. Die e e'-Schleife enthält auch die 20 zusätzlichen Aminosäuren der TBX3-Spleißvariante TBX3+2a. Durch alternatives Spleißen enthält TBX3+2a das 60 bp umfassende Exon 2a, welches Teil aller Säuger *TBX3*-Gene ist.^[155] Hoogaars *et al.* konnten weder einen Einfluss der zusätzlichen 20 Aminosäuren auf die DNA-Bindung *in vitro* noch auf die Interaktion mit Nkx2-5 oder auf die TBX3-vermittelte Repression bezüglich zweier natürlicher Promotoren (p21 und Nppa) feststellen.^[155] Zudem wurde kein Unterschied bei der Interaktion mit Sox4 entdeckt.^[175] Dennoch ist dieses Thema kontrovers.^[138,176] Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die Verkürzung der e e'-Schleife keinen Effekt auf die DNA-Bindung *in vitro* sowie auf die Zielgenrepression hatte. Der Aminosäurerest N212 ist in T-box-Proteinen weitgehend konserviert (siehe Tab. 6.1). Nur die meisten Mitglieder der Säuger Tbx6-Unterfamilie tragen an dieser Position ein Serin. Da den Mitgliedern der T-Unterfamilie (Brachyury und TBX19) dieser Aminosäurerest fehlt, ist zu vermuten, dass die Position N212 nicht essentiell für die T-box-Funktion ist. Entsprechend dieser Vermutung war die DNA-Bindung durch den Verlust von N212 nur minimal eingeschränkt (siehe Abb. 6.9).

In der Röntgenstruktur des *TBX3*-DNA-Komplexes ist T210 Teil des kurzen β -Strangs e, welcher innerhalb der T-box-Proteinfamilie die vollständig konservierten Aminosäuren 208 - 211 umfasst (siehe Tab. 6.1). Da K208 und N211 sowohl in humanem TBX3 als auch in *Xenopus* Brachyury mit der Ziel-DNA interagieren^[7,8], haben Strukturveränderungen in diesem Bereich vermutlich weitreichende funktionelle Konsequenzen für das betroffene Protein. So verhinderte die Mutation des dem K208-Rest von TBX3 entsprechenden Lysin zu Arginin die DNA-Bindung sowie die Zielgenaktivierung durch TBX19.^[177] Die Mutation T209l in Tbx20 (T209 in Tbx20 entspricht T210 von TBX3, siehe Tab. 6.1) führte in einem *ex vivo*-Assay bei geringen Konzentration an mutantem Protein zu einer reduzierten Aktivierung endogener Zielgene. Dagegen war das mutante Protein bei hohen Konzentrationen ebenso effektiv wie das wildtypische Tbx20-Protein.^[178] Unter diesem Aspekt scheinen die Mutationen Tbx20-T209l und TBX3-T210delT ähnlich. Die Mutation T210delT führte zu einer Reduktion der Bindeaffinität für T-box-Zielsequenzen, eliminierte diese aber nicht (siehe. Abb. 6.9).

Die Position H187 ist in der T-box-Proteinfamilie vollständig konserviert (siehe Tab. 6.1). Innerhalb der TBX3/DNA-Struktur ist H187 im β -Strang C' lokalisiert, welcher Teil der sieben ineinander verwobenen β -Strukturen ist, welche den Kern der T-box-domäne bilden. Obwohl C' keinen Kontakt zur DNA hat, führt die H187Y-Mutation zu Strukturveränderungen, die eine effektive Bindung des mutanten Proteins an seine Zielsequenzen verhindern. Dieselbe Missense-Mutation an korrespondierender Position (H125Y) wurde in Tpit (TBX19) identifiziert. Tpit-H125Y konnte im EMSA nicht an die palindromische Konsensus-Sequenz binden und versagte im transienten Reporterassay bei der Zielgenaktivierung.^[177]

Zusätzlich zu H187Y waren mit L112F und W113R zwei weitere, von Kandoth *et al.* identifizierte, potentielle Treibermutationen innerhalb der T-box-Domäne lokalisiert und voll konserviert.^[77] Da diese jeweils nur ein einziges Mal gefunden wurden, waren diese beiden Mutationen nicht Teil der Mutationsstudie dieser Arbeit.

7.1.3 Repressionsstärke der potentiell treibermutanten

TBX3-Proteine

Im transienten FLuc-Reporterassay konnten die DNA-Bindemutanten TBX3-Proteine TBX3dm (siehe Abb. 6.12 A, 6.13 A) und H187Y (6.13 A) den p21-Luc-Promotor weiterhin um 40 - 60 % reprimieren. Wie auch die TBX3-vermittelte p21-Luc-Repression erfolgte dies Dosis-abhängig (siehe Abb. 6.12). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die TBX3-vermittelte p21-Luc-Repression durch mehr als einen Mechanismus erfolgt. Im ersten Mechanismus agiert TBX3 als aktiver, DNA-gebundener Repressor und in einem zweiten als Co-Repressor. Die Repression durch TBX2 und TBX3 basiert auf einer dominanten C-terminalen Repressordomäne.^[10,32,35,179] Für TBX3 konnte gezeigt werden, dass diese Repressordomäne für die Immortalisierung primärer embryonaler Fibroblasten ausreicht.^[32] Die verkürzte Mutante Y163fs2* konnte ohne vollständige DNA-Bindedomäne und ohne Repressordomäne den p21-Promotor nicht reprimieren (siehe Abb. 6.13 A und 10.2). TBX2 agiert durch Bindung an den Transkriptionsfaktor EGR1 als Co-Repressor von zwei mit Brustkrebs assoziierten Tumorsuppressorgenen (NDRG1 und CST6).^[34,69] Daher sind beide Repressionsmechanismen denkbar. Im Kontrast dazu konnte TBX3dm das endogene *p21*-Gen nicht reprimieren (siehe Abb. 6.14), was eine höhere Stringenz des

Co-Repressormechanismus im natürlichen chromosomalen *p21*-Kontext impliziert.

Die durch die TBX3-Treibermutanten vermittelte p21-Repression im transienten FLuc-Assay korrespondierte mit der *in vitro* ermittelten DNA-Bindung (siehe Abb. 6.9). Ohne DNA-Bindedomäne konnte Y163fs2* weder DNA binden (siehe Abb. 6.9) noch den p21-Luc-Promotor reprimieren (siehe Abb. 6.13 A). Die von H187Y mit geringer DNA-Bindung vermittelte p21-Luc-Repression unterschied sich nicht von der Repression der DNA-Bindemutanten TBX3dm. Die p21-Luc-Repression durch T210delT lag entsprechend der ermittelten DNA-Bindung zwischen der Repression von normalem TBX3 und TBX3dm. Die DNA-Bindung war durch die Mutation N212delN nur geringfügig eingeschränkt und entsprechend war N212delN ein annähernd so guter p21-Luc-Repressor wie normales TBX3 (siehe Abb. 6.13 A). Die normierten GLuc-Daten bestätigen N212delN als nahezu wildtypischen p21-Luc-Repressor (siehe Abb. 6.10). Dagegen scheinen die Mutanten Y163fs2*, H187Y und T210delT sowie TBX3dm bezüglich der *in vitro* p21-Repression Funktionsverlustmutanten zu sein. Aufgrund der partiellen DNA-Bindung von T210delT und H187Y (siehe Abb. 6.10) unterstützen die GLuc-Daten die Co-Repressortherorie.

Im Gegensatz dazu waren alle drei getesteten Punktmutationen effektive Repressoren des endogenen *p21*-Gens, was darauf hindeutet, dass die TBX3-vermittelte Repression im nativen Chromatinkontext nur eine teilweise funktionstüchtige T-box erfordert (siehe Abb. 6.14). Zusätzlich zur DNA-Bindung wird die T-box auch für Protein-Protein-Interaktionen benötigt. So wird die Interaktion zahlreicher Chromosomen-assoziiierter Proteine über die T-box-Domäne reguliert.^[166,180–186] Vermutlich erlauben geringe Störungen innerhalb der T-box die Bindung dieser Faktoren im nativen Chromatinkontext und ermöglichen dadurch die Gen-Repression durch TBX3-Varianten mit verminderter DNA-Bindung.

7.1.4 Somatische *TBX3*-Mutationen bei Brustkrebstumoren

Die Analyse von TBX-Mutationen im ICGC-Datenset ergab, dass unter den 16 analysierten humanen paralogen *TBX*-Genen *TBX3* das am häufigsten mutierte *TBX*-Gen bei Brustkrebs (BRCA-US) war. Darüber hinaus waren *TBX3*-Mutationen sowohl in Prostata-Adenokarzinomen (TCGA-US und UK) als auch bei renalen, papillaren Zellkarzinomen der Nieren (TCGA-US) im Vergleich am häufigsten. Jedoch war die Anzahl der Mutationen im

Vergleich zu Brustkrebs um das Fünf- bis Zehnfache geringer, wodurch diese Anhäufung vermutlich statistisch nicht signifikant ist (siehe Tab. 6.2, 10.1 und 10.2). Die Assoziation von *TBX3*-Mutationen mit der Entwicklung von Brustkrebs ist offensichtlich. Hierbei korreliert die Häufigkeit der *TBX3*-Mutationen nicht mit der genomischen Größe des *TBX3*-Gens, da diese geringer ist als die Durchschnittsgröße eines *TBX*-Gens. Da der ORF bei *TBX*-Genen im Vergleich zur genomischen Größe nur um das Zweifache variiert, wurde der Größeneffekt durch Konzentration auf Mutationen, die den ORF betreffen, reduziert. Im direkten Vergleich der Datensätze der analysierten, somatischen Krebsgenomprojekte waren im Vergleich aller *TBX*-Gene zwei Arten von Mutationen signifikant vorwiegend im ORF von *TBX3* zu finden: Frameshift-Mutationen und In-Frame-Deletionen (siehe Tab. 10.4 A). Ein Großteil dieser Mutationen wurde in Brustkrebs gefunden (71 % und 40 %, Vergleich von Tab. 6.3 mit 10.4 A). Die Begrenzung der Analyse auf Brustkrebs ergab ebenso eine geringe Anreicherung von Missense-Mutationen in *TBX3* (siehe Tab. 6.3). Frameshift-Mutationen führen i.d.R. durch Einführung frühzeitiger Stopp-Codons zu einem verkürzten Protein. Je N-terminaler die Mutation im Protein lokalisiert ist, desto mehr wichtige Domänen fehlen und desto schwerwiegender ist der Effekt der Mutation auf die Funktion des Gesamtproteins. Die in Brustkrebs gefundenen *TBX3*-Frameshift-Mutationen zeigten eine extreme Tendenz zur Lokalisation im N-terminalen Bereich des *TBX3*-Proteins (siehe Abb. 6.17). Mit Ausnahme von N673fs führten alle anderen *TBX3*-Frameshift-Mutationen zu einem Funktionsverlust, entweder durch Deletion der DNA-Bindedomäne oder durch Deletion der nukleären Lokalisationssequenz (NLS, R294fs). Da die verkürzte E307fs-Mutante eine funktionelle T-box-Domäne enthält, könnte diese Mutation einen dominant-negativen Effekt auf die *TBX3*-Funktion haben.^[53,187–189] Hier konnte für die Y163fs2*-Mutante ein vollständiger Verlust der DNA-Bindung (siehe Abb. 6.9) sowie ein Verlust der p21-Luc-Repression (siehe Abb. 6.13 A und 10.2) gezeigt werden. Im Fall der Missense-Mutationen kann aufgrund der verbleibenden Restfunktion keine einfache Schlussfolgerung gezogen werden. Die Anreicherung der Mutationen innerhalb konservierter Aminosäurepositionen läßt darauf schließen, dass die meisten Mutationen zu einem Funktionsverlust führen.

Die Daten dieser Arbeit bezüglich der Frameshift-Mutante Y163fs2*, der Missense-Mutante H187Y und den beiden In-Frame-Deletionsproteinen T210delT und N212delN zeigten sowohl *in vitro* (EMSA) als auch in der Zellkultur (p21-FLuc-Repression) einen partiellen oder

vollständigen Funktionsverlust. Während dieser Funktionsverlust mit den Erwartungen der bereits erwähnten, statistischen Analyse der *TBX3*-Mutationen in Brustkrebstumoren einhergeht, steht diese Beobachtung im Kontrast zu vorherigen Beobachtungen bezüglich der Rolle von *TBX3* während der Onkogenese. Generell war es Überexpression von *TBX3*, die mit onkogenen Prozessen im organischen, zellulären und regulatorischen Regulationslevel in Verbindung gebracht wurde. Dieser Widerspruch gilt entsprechend der vorliegenden Arbeit hauptsächlich nur für Brustkrebs und Melanome, aber ähnliche Funde wurden ebenso für andere Tumortypen gemacht.^[74,164,190–192]

TBX3 wird sowohl in Brustkrebszelllinien als auch im primären Brustkrebsgewebe exprimiert.^[138,139] Ein erhöhtes Level an *TBX3* wurde im Blutplasma von Patienten mit in fortgeschrittenen Stadien befindlichen Brustkrebstumoren gefunden.^[193] Ein erhöhtes *TBX3*-Level wurde ebenso in Melanom-Zelllinien gefunden^[194], wo *TBX3* die Expression des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin reprimierte und mit einer erhöhten Invasivität^[53,71,72] sowie auch einer Tumorformation *in vivo* einhergeht^[73]. Eine kritische Rolle für *TBX3* für die Migration von Zellen wurde in der Brustkrebszelllinie MCF7 demonstriert.^[72,195]

Zudem antagonisiert die Expression von *TBX3* die replikative und onkogene Seneszenz durch Repression von p14ARF. Dies wurde für eine konditionell transformierte, neuronale Mauszelllinie^[37] sowie für primäre Mausfibroblasten gezeigt^[32,196], bisher jedoch nicht für Brustgewebezellen.

TBX3 fördert das Wachstum von epithelialen Brustgewebezellen sowohl in der Zellkultur^[197] als auch in transgenen Mäusen, wo die *TBX3*-Expression zwar zu einer Hyperplasie nicht aber zur Tumorformation führte^[198]. In humanen Brustkrebszelllinien sowie primärem Tumorgewebe unterstützt *TBX3* den Effekt von Östrogen, die Bildung und Expansion von stammzellartigen Krebszellen zu induzieren.^[199] Der Effekt auf das Proliferationsverhalten steht in Abhängigkeit zu dem jeweiligen Zelltyp. In der Brustkrebszelllinie MCF7 sowie in Melanomzelllinien der vertikalen Wachstumsphase, welche beide endogenes *TBX3* exprimieren, förderte der Verlust von *TBX3* (Knock-down) die Proliferation.^[72] Ein ähnliches Phänomen wurde für das *TBX3*-Ortholog *Omb* in der Flügelimaginalscheibe von *Drosophila* beobachtet. In der Flügelimaginalscheibe antagonisiert die *Omb*-Überexpression die Proliferation in Regionen mit hohem endogenem *Omb*-Level und fördert die Proliferation in Regionen mit niedrigem *Omb*-Level (und umgekehrt). Die Überexpression von *Omb*

führt zu einer invasiven Zellmotilität in allen Regionen des Epithels der Scheibe.^[200]

Von den in dieser Arbeit analysierten TBX3-Mutanten zeigte nur N212delN ansatzweise eine Funktionserhöhung (gain-of-function): Im Vergleich zum normalen TBX3 hatte N212delN sowohl ein höheres Vorkommen an Transkript (siehe Abb. 6.14) als auch an Protein (siehe Abb. 6.13B). Dennoch unterschied sich N212delN in den Repressionsassays des endogenen *p21* sowie des transfizierten p21-Luc nicht signifikant von der Funktion des normalen TBX3. Das von den Tandem-Codons AAC codierte N211-N212-Douplet könnte anfällig für Slippage-Defekte während der Replikation oder der DNA-Reparatur sein, so dass unter genomischem Stress die Mutation N212delN in Zellen als neutrale Mutation auftreten könnte.

7.1.5 Der Einfluss der Mutation Y149S auf die TBX3-vermittelte p21-Repression

Die Y149S-Mutante führte im transienten Reporterassay zu einer im Vergleich zum normalen TBX3 signifikant verminderten p21-Luc-Repression (siehe Abb. 6.20 A), welche vergleichbar mit der von TBX3^{dm} und Y163fs2* war. Analog zeigten Brummelkamp *et al.*^[37], dass die Y149S-Mutante im Vergleich zu TBX3 den p14ARF-Promotor im transienten Reporterassay nicht inhibieren konnte. p14ARF und p21 sind neben p16INK4A die Hauptmediatoren bei der Entstehung der zellulären Seneszenz. Somit führt die Y149S-Mutation zu einem Verlust der immortalisierenden Funktion von TBX3 und mit der Y149S-Mutante transfizierte ST.HdhQ111-Zellen sowie MEF-Zellen konnten im Vergleich zu TBX3-transfizierten Zellen die Seneszenz nicht umgehen.^[37] In der Röntgenstruktur des TBX3-DNA-Komplexes ist die Position Y149 am Ende des β -Barrel distal der DNA lokalisiert.^[8] Die in UMS-Patienten entdeckte Y149S-Mutation führt zur Instabilität der T-box-Domäne und folglich zu einer schwerwiegenden Beeinträchtigung der DNA-Bindung.^[8] Dies impliziert Y149S als eine für die DNA-Bindung wichtige Position, was aber bisher nicht überprüft wurde. Die Tatsache, dass Y149S ein guter endogener *p21*-Repressor war (siehe Abb. 6.20 E), unterstützt die bereits in Kap. 7.1.3 aufgestellte These, dass der native Chromatinkontext zur Repression eine nur teilweise funktionstüchtige T-box erfordert. Das Y149S-Proteinlevel war, vergleichbar mit TBX3^{dm}, um ca. die Hälfte niedriger als die Menge an normalem TBX3 (siehe Abb. 6.20 B), wobei die niedrige Y149S-Konzentration

auf einer signifikant geringeren *TBX3*-Transkriptionsrate basieren könnte (siehe Abb. 6.20). Dagegen zeigten Brummelkamp *et al.* identische Proteinkonzentrationen von transient in COS-7-Zellen exprimiertem *TBX3*- und Y149S-Protein.^[37] Diese Widersprüche basieren auf technischen Unterschieden. Zwar wurden sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch bei Brummelkamp *et al.*^[37] COS-7 für 48 h transient transfiziert, doch wurden neben anderen Konstrukten (Brummelkamp: N-terminaler HA-tag in pcDNA3.1) unterschiedliche Transfektionsmethoden (Calciumphosphat vs. FuGENE HD) angewendet. Bei Brummelkamp fehlt zudem eine Beladungskontrolle.

Da der dominant-negative-Effekt von Y149S bezüglich der p21-Expression hier nicht überprüft wurde, kann dieser weder ausgeschlossen noch bestätigt werden. Interessanterweise verweisen Renard *et al.*^[164] bei der Beschreibung der dominant-negativen Funktion von Y149S auf Bamshad *et al.*^[24]. Diese vermuten allerdings, dass es sich bei den beschriebenen UMS-Mutanten wohl eher nicht um dominant-negative Mutanten handeln kann.^[24]

7.1.6 Regulation der *TBX3*-Aktivität durch posttranslationale Modifikationen: Die Rolle von SUMOylierung und Phosphorylierung für die p21-Repression

Die zahlreichen Möglichkeiten die Funktionalität von Proteinen über PTMs zu steuern sind der Schlüssel der funktionelle Diversität.^[78,79] Die hier untersuchte S674-Mutante (Phosphorylierung) sowie die D275K-Mutante (SUMOylierung) zeigten keinen Effekt auf die *TBX3*-vermittelte p21-Repression. Beide Mutanten waren wildtypische p21-Repressoren im transienten Reporterassay (siehe Abb. 6.20 A) und im Vergleich zu *TBX3* signifikant stärkere Repressoren der endogenen *p21*-Aktivität (siehe Abb. 6.20 E). Letzteres ist möglicherweise eine Konsequenz der im Vergleich zu *TBX3* höheren Proteinkonzentrationen (siehe Abb. 6.20 B-D), welche Defizite in der Repressorfunktion womöglich ausgleichen. Ob die beiden Mutationen „nur“ stabilisierend auf *TBX3* wirken oder einen direkten Effekt auf die p21-Repression haben, müsste durch Experimente bei einheitlicher Proteinexpression überprüft werden.

Die Phosphorylierung erfolgt in Eukaryoten hauptsächlich an den Aminosäureresten von Serin, Threonin und Tyrosin.^[82] Aufgrund des zahlreichen Vorkommens dieser drei Aminosäuren in der *TBX3*-Proteinsequenz sind zusätzlich zu der hier untersuchten Position

S674^[160], weitere Phosphorylierungsstellen wahrscheinlich. So konnten Peres *et al.*^[201] die Überexpression und nukleäre Lokalisation von TBX3 in Melanoma-Zellen auf die AKT3-vermittelte Phosphorylierung von TBX3 an Position S720 zurückführen, welche die TBX3-vermittelte E-Cadherin-Repression und somit das migratorische Potential und die Invasivität erhöht.

Die SUMOylierung ist ein genereller Mechanismus bei der Genregulation und sowohl humanes TBX2 als auch murines Tbx3 werden SUMOyliert.^[161] Die starke p21-Repression durch TBX3-D275K steht neben dem Befund, dass die entsprechende K271R-Mutation die SUMOylierung von TBX22 verhindert.^[163] Den Verlust der Repression von K271R im transienten Reporterassay konnten Andreou *et al.* auf den Verlust der DNA-Bindung zurückführen^[163], weshalb hier nicht die korrespondierende Position K273 sondern D275 im TBX3-Protein untersucht wurde. Die starke Repression des p21-Promotors durch die D275K-Mutante bestätigt das Ergebnis von Huber *et al.*^[161], dass die TBX-2-Funktion zwar auf SUMOylierung basiert, diese aber nicht prinzipiell für die TBX-2 Repressorfunktion benötigt wird. Da die Repression der T-box-Faktoren nicht prinzipiell auf SUMOylierung basiert, bleibt dessen Rolle für die TBX3-vermittelte p21-Repression ungeklärt. Aufgrund der biologischen Signifikanz der SUMOylierung^[91,92], wäre auch eine funktionelle Redundanz mehrerer SUMOylierungsstellen denkbar. So wurden im TBX3-Protein mehrere SUMOylierungsstellen identifiziert (siehe Tab. 6.4), welche für die SUMOylierung wichtig sein könnten, aber nicht Teil dieser Mutationsstudien waren. So benötigt die SUMOylierung von *C. Elegans* TBX-2 zwei SUMOylierungsstellen, von welchen die Interaktion mit dem E2-SUMO-konjugierenden Enzym Ubc-9 abhängt.^[161,202] Zudem könnte die SUMO-TBX3-Interaktion auch über nicht-kovalente Bindung wie sog. SUMO-Interaktions-Motive (SIM) erfolgen. Ebenso denkbar für die Genregulation ist eine Kombination aus verschiedenen regulatorischen PTMs^[79], was zum einen die regulatorische Vielfalt erhöht, zum anderen aber die Untersuchung deutlich erschwert.

7.1.7 Die Rolle von Interaktionspartnern für die TBX3-vermittelte p21-Repression

Trotz der starken Konservierung der T-box können die Mitglieder der T-box-Genfamilie unterschiedliche Zielgene erkennen und regulieren. Die Identifikation der molekularen

Mechanismen der Zielgenspezifität sowie die Transkriptionskontrolle sind daher für das genauere Verständnis der Funktionalität der T-box-Faktoren essentiell. Zum einen kann die Zielgenspezifität über die Heterodimerisierung mit Interaktionspartnern erfolgen, wie es für Tbx2 mit NRAGE^[68] und EGR1^[69] gezeigt wurde. Die Funktionalität von Tbx2 kann auch über die Interaktion mit dem Zellzyklus-Regulator Rb1 moduliert werden.^[64] Zwar läßt die starke Homologie von TBX2 und TBX3 sowie die konservierte Rb1-Interaktionsdomäne auf eine Tbx2-analoge Rb1-Interaktion mit TBX3 schließen, diese wurde jedoch noch nicht nachgewiesen. Während Tbx2 durch die LALA (L294A/L296A)-Mutation im Reporterassay eine eingeschränkte p21-Luc-Repression aufweist^[64], verhielt sich die korrespondierende TBX3-Mutante LALA (M302A/V304A) im transienten Reporterassay in COS-7 wildtypisch (siehe Abb. 6.20 A). Das endogene *p21* wurde durch die TBX3-LALA-Mutante sogar stärker reprimiert als durch wildtypisches TBX3 (siehe Abb. 6.20 E). Dieser Effekt könnte evtl. auf der im Vergleich zum normalen TBX3-Protein erhöhten Proteinkonzentration basieren (siehe Abb. 6.20 B - D). Mehrere Gründe können für die anscheinende Diskrepanz zwischen den Befunden mit Tbx2^[64] und TBX3 (diese Arbeit) verantwortlich sein: Unterschiede in den verwendeten Zellen (Phoenix vs. COS-7) und der endogenen Rb1-Expression. Ein von C. Goding erhaltener Tbx2-Plasmidklon mit der L294A/L296A-Doppelmutation trug eine zusätzliche Mutation (E90V), die eine voll konservierte Aminosäure betrifft, welche direkt N-terminal von der T-box-Domäne liegt. Dagegen war die hier verwendete TBX3-Doppelmutante an dieser Position wildtypisch. Letztlich kann auch der Unterschied zwischen Tbx2 und TBX3 verantwortlich sein.

Zusätzlich steuern T-box-Faktoren die Zielgenspezifität über epigenetische Mechanismen. So kann T-bet die Genregulation durch Rekrutierung der Histon-Methyltransferasen H3K4 und H3K27 steuern.^[183,203] Da diese Interaktion über konservierte Aminosäuren erfolgt, könnte es sich hierbei um einen generellen Mechanismus der T-box-Faktoren handeln. Tbx2 kann zur transkriptionellen Repression Histon-Deacetylasen (HDACs), z.B. HDAC1, zum Zielpromotor rekrutieren^[53] und bindet speziell an das Amino-Ende von Histon H3.^[181] Auch bei der TBX3-vermittelten p14-Repression spielt die Interaktion mit HDACs eine wichtige Rolle.^[139] Da viele Co-Repressorkomplexe HDACs enthalten^[98], spielt die Rekrutierung von Co-Repressoren zur TBX3-vermittelten p21-Repression, wie bereits in Kap. 7.1.3 angesprochen, eine mögliche Rolle. Diese These konnte am Beispiel des p21-Promotors (p21-Luc und *p21*-qPCR) in der verwendeten COS-7-Zelllinie nicht bestätigt

werden, da alle getesteten Gro/CtBP-Interaktionsmutanten etwa gleich aktiv waren (siehe Abb. 6.23). Dieses Ergebnis schließt aber weder die Interaktion mit Gro/TLE-Faktoren noch die Interaktion mit CtBPs aus. So sind in den Sequenzen der T-box-Faktoren von *C. elegans*, *Drosophila* und Mensch zahlreiche Gro/TLE-Interaktionsmotive zu finden.^[204]

7.2 Erzeugung einer Zelllinie als Screeningsystem zur Identifizierung TBX2-inhibierender Wirkstoffe

Die Fluoreszenzmikroskopie zählt zu den wichtigsten Instrumenten zur Auffindung von pharmakologisch aktiven Substanzen im zellbiologischen System.^[205] Da die Weiterentwicklung der Fluoreszenzmikroskopie die Möglichkeit der automatisierten Erfassung und Analyse von fluoreszierenden Systemen bietet, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein stabiles zelluläres Fluoreszenz-basiertes Reporterassay-System zum Hochdurchsatzscreening (HDS) von TBX2-inhibierenden Substanzen im Mikroplattenformat etabliert werden. Das zelluläre System sollte neben induzierbarem TBX2 das Reporterogen d2EGFP (engl.: destabilized Enhanced Green Fluorescent Protein) unter der Kontrolle des p21-Promotors exprimieren. Da TBX2 ein starker Repressor des p21-Promotors ist^[36], sollte die TBX2-Aktivität auf zellulärer Ebene direkt und unabhängig von Cofaktoren über die d2EGFP-Expression gemessen werden können.

Die Herausforderung bei der Etablierung der Reporterzelllinie war die stabile Integration von drei Zielgenen in das Wirtszellgenom. Bei jeder stabilen Transfektion wurde nur ein codierendes Plasmid inklusive Selektionsmarker in das zelluläre Genom integriert. Dies machte die Etablierung der Zelllinie sehr langwierig. Um einen Verlust der integrierten Plasmide zu vermeiden, mussten die entstandenen Zelllinien unter stetigem Selektionsdruck kultiviert werden.^[169] Die qualitative Überprüfung der selektierten Klone sowie des Reportersystems im Allgemeinen erfolgte nach transienter Transfektion.

7.2.1 Transiente Transfektion zur qualitativen Überprüfung des Reportersystems

Transiente Transfektionen bieten im Vergleich zu stabilen Transfektionen den Vorteil, dass mehrere Transfektionen schnell und einfach parallel durchgeführt werden können. Sie

führen zu einem schnellen Ergebnis, da das Expressionsmaximum innerhalb eines Zeitraums von 24 - 72 h erreicht wird. Ohne Selektionsdruck verweilen die aufgenommenen Plasmide nur für einen begrenzten Zeitraum in der Wirtszelle.^[169] Daher wurden transiente Transfektionsstudien durchgeführt, um einfach und schnell die generierten Konstrukte bezüglich ihrer Funktionalität zu testen (siehe Abb. 6.26, 6.28 und 6.31) und gleichzeitig die Qualität des Reportersystems allgemein sowie im Hinblick auf zu etablierende Zelllinie zu überprüfen. Ebenso wurden nach transients Transfektion die besten stabilen Klone für Folgeexperimente selektiert (siehe Abb. 6.27, 6.28 und 6.38).

Im transienten System konnte gezeigt werden, dass TBX2-Protein induziert wurden (siehe Abb. 6.26), was sowohl in COS-7-Zellen (siehe Abb. 6.26) als auch in ausgewählten COS-7/pEF1 α -Tet3G-Klonen (siehe Abb. 6.28) die p21-Luc-Aktivität reprimierte. Auch die induzierte TBX2-Expression stabiler COS-7/pEF1 α -Tet3G/pTRE3G-TBX2-Klone führte zu einer um etwa die Hälfte reduzierten p21-Luc-Aktivität (siehe Abb. 6.28), was den Angaben der Literatur entsprach^[159]. Dies zeigte, dass das auf der p21-Repressoraktivität von TBX2 basierende Luciferase-Reportersystem einwandfrei funktionierte. Dieses System sollte nun auf ein Fluoreszenz-basiertes System übertragen werden, da für das HDS-Screeningsystem d2EGFP aufgrund der direkten Detektierbarkeit der Fluoreszenz auf Einzelzellebene sowie der geringen Halbwertszeit als Reporter gen gewählt wurde.

Der Nachweis der p21-regulierten d2EGFP-Expression nach transients Transfektion des zu diesem Zweck hergestellten p21-d2EGFP-Konstrukts erwies sich mit den verwendeten Detektionsmethoden als schwierig. Ein Vergleich mit einem p21-regulierten stabilen GFP, wie z.B. maxGFP, als Reporter gen war nicht möglich, da die Generierung eines entsprechenden Reporter genkonstrukts nicht gelungen ist. Bereits die schwach GFP-positiven Banden bei Überprüfung der TBX2-regulierten p21-d2EGFP-Expression mittels Western Blot (siehe Abb. 6.31) deuteten auf eine geringe zelluläre d2EGFP-Konzentration hin. Die Überprüfung der Transfektionseffizienz mittels Luciferase-Reporter genassay (siehe Abb. 6.32) zeigte, dass die schwachen d2EGFP-Banden nicht durch den für d2EGFP-unspezifischen GFP-Antikörper verursacht wurden, sondern auf einer geringen Transfektionseffizienz basiert. Da die Menge an synthetisiertem Protein mit einer optimalen physiologischen Transfektionseffizienz korreliert, ist diese insbesondere beim instabilen d2EGFP unbedingt erforderlich. Daher wurde für Folgeexperimente die optimierte Transfektionsbedingung von 0,5 μ g/ml Plasmid-DNA und 3 μ l/ml FuGENE HD festgelegt (siehe Abb. 6.32). Zur

schnelleren und unkomplizierten Überprüfung der Fluoreszenz wurde das Experiment zur Überprüfung der TBX2-regulierten p21-d2EGFP-Expression mittels der sensitiveren FACS-Methode wiederholt. Aber auch das FACS lieferte kein aussagekräftiges Ergebnis. Die geringe Expression/Stabilität von d2EGFP ließ die reprimierende Wirkung von TBX2 und TBX3 gegenüber der Kontrolle kaum erkennen (siehe Abb. 6.33). Überraschenderweise bewirkten die mutierten Formen von TBX2/3 eine auch gegenüber der Kontrolle erhöhte d2EGFP Expression. Es ist denkbar, dass TBX2/3 im DNA-ungebundenen Zustand Faktoren bindet, die zur Repression des p21-Promotors beitragen (engl.: squelching)^[206,207]. Dabei muss angenommen werden, dass TBX2/3 nicht die einzigen Faktoren sind, die p21 reprimieren.

Im Vergleich zum stabilen maxGFP resultierte die geringe Expression/Stabilität von d2EGFP in einem deutlich geringeren MFI (siehe Abb. 6.33 B) sowie einer geringeren GFP-positiven Zellpopulation (siehe Abb. 6.33 A). Dies führte zu einer deutlich höheren Detektionsschwelle für d2EGFP, weshalb auch die photometrische Fluoreszenzbestimmung mittels TECAN-Reader nicht die geeignete Messmethode für die d2EGFP-Emission war. Hier konnte kein d2EGFP-Signal über dem Hintergrund detektiert werden (siehe Abb. 6.34), was auf ein ungünstiges Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis schließen ließ. Dieses wird durch die Autofluoreszenz von COS-7-Zellen, der Anwesenheit von Medium bei der Messung sowie der Fluoreszenz der Platten negativ beeinflusst. Aufgrund der hohen Detektionsschwelle war die Detektion des p21-regulierten d2EGFP-Proteins auch mittels Cellomics Arrayscan VTI HCS Reader nicht möglich. Das mehrmalige Überprüfen der Transfektionseffizienz bestätigte sowohl im Luciferase-Reportergenassay (siehe Abb. 6.32) als auch im TECAN-Reader (siehe Abb. 6.34), dass die Transfektionsbedingung von 0,5 µg/ml Plasmid-DNA und 3 µl/ml FuGENE HD zu einer optimalen Proteinexpression führte. Der starke Abfall der Proteinkonzentration bei einer DNA-Konzentration ab ca. 1 µg/ml könnte auf eine für COS-7-Zellen unphysiologische DNA-Menge hindeuten. Eine zu hohe DNA-Konzentration würde die endogene Transkriptionsmaschinerie der Zelle überlasten, was sich in einer geringeren Genexpression widerspiegelt. Ebenso könnte die geringe Expressionsrate auf einem ineffizienten Verhältnis von DNA:Transfektionsreagenz basieren. Dies führt zu einer gestörten Bildung der Transfektionskomplexe und folglich zu einer geringeren Transfektionseffizienz.

Zusammenfassend zeigte sich, dass d2EGFP als Reportergen zur Überprüfung der TBX2-

regulierten p21-Expression im transienten System ungeeignet war. Die geringe Menge an zellulär angereichertem d2EGFP-Protein erschwerte die Detektion mit allen gewählten Methoden.

Weiterhin wurde mit der Generierung der Zelllinie fortgefahren, da davon ausgegangen wurde, dass die Detektionsschwelle von d2EGFP bei einer stabilen d2EGFP-exprimierenden Zelllinie niedriger wäre, da nun alle Zellen das d2EGFP-Reportergen im gleichen Maßstab exprimieren würden. Auch C. Hellweg beschrieb in ihrer Dissertation, dass erst bei einer Konfluenz von 50 - 100 % und konstitutiv d2EGFP-exprimierenden AA8pCMV-d2EGFP-Zellen die Fluoreszenz bei der Messung an einem Mikroplatten MTP-Fluorometer über dem Hintergrund detektiert werden konnten.^[208] Daher wurde trotz der Probleme bei der d2EGFP-Detektion im transienten System die Zelllinie #A6.17 zur Generierung der dreifach stabilen Zelllinie gewählt (siehe Abb. 6.38). Da die Etablierung der dreifach stabilen Zelllinie nicht gelang (siehe Kap. 6.4.6.7), ist keine Aussage zur Eignung von d2EGFP im stabilen System möglich.

7.2.2 Generierung einer dreifach stabilen Zelllinie

Für den Erfolg der stabilen Transfektion von Säugerzellen sind Faktoren wie die Anzahl der pro Zelle aufgenommenen Plasmidkopien, die Transkriptionsrate des Gens, die Stabilität des mRNA-Transkripts sowie der Integrationsort des Plasmids im Wirtszellgenom entscheidend.^[209] Insgesamt sind die Erfolgchancen gering. So integriert von 10^4 transfizierten Zellen nur etwa eine Zelle die aufgenommene Plasmid-DNA stabil in ihr Genom^[210], wobei der Ort der genomischen Integration bei den meisten Transfektionsmethoden auf dem Zufall basiert. Die Plasmide können in aktive oder in inaktive Bereiche des Genoms integrieren, wobei die Wahrscheinlichkeit der Integration in einen aktiven Bereich eher gering ist.^[211] Bei der häufigeren Integration in einen inaktiven Bereich ist die Transkriptionsrate gering bis ganz fehlend.

Zudem können zelluläre Enzyme durch Linearisierung der eingebrachten DNA auch relevante Bereiche des Vektors, wie die Promotorregion, das Selektionsgen oder das Zielgen selbst, zerstören und dadurch die Zielgenexpression negativ beeinflussen. Die Fähigkeit von Säugerzellen zum nicht homologen End-Joining (NHEJ) führt dazu, dass die cotransfizierte DNA im Zellkern physikalisch miteinander verknüpft wird.^[212,213] Daher werden

cotransfizierte Plasmide nach Bildung von Concatemeren häufig auch in denselben Lokus cointegriert^[214], wobei Concatemer eine Serie von bestimmten, sich in linearer Folge wiederholenden DNA-Einheiten bezeichnet. Somit ist auch die Anzahl an integrierten Kopien heterogen. Da sowohl der Integrationslokus als auch die Anzahl der integrierten Plasmide dem Zufall unterliegen, kann die Expressionsrate der Zielproteine wie gezeigt (siehe Abb. 6.29) stark variieren. Daher wurden zahlreiche Klone zur Überprüfung der Zielgenexpression isoliert. Von den 92 isolierten COS-7/pEF1 α -Tet3G/pTRE3G-TBX2-Klonen überlebten 33 die Überführung von der Petrischale auf die Well-Platte. Die restlichen 59 Klone starben womöglich infolge der durch die stabile Integration der exogenen DNA entstandenen genomischen Instabilität. Da tote Zellen ihre Adhärenz im Zellverband nicht so schnell verlieren, machte sich der Tod eines Klons häufig erst in Suspension bemerkbar. Die Überprüfung der stabilen Klone hinsichtlich der Zielgenexpression (siehe Abb. 6.27 und 6.29) bestätigte, dass die meisten Klone erwartungsgemäß eher geringe Mengen an Protein exprimieren. Entsprechend ihrer FLuc-Fold Induction wurden 6 von 31 COS-7/pEF1 α -Tet3G-Klonen für Folgeexperimente gewählt. Von den 33 im Western Blot getesteten COS-7/pEF1 α -Tet3G/pTRE3G-TBX2-Klonen exprimierten 8 eine nachweisbare Menge an induziertem TBX2-Protein mit deutlich variierendem Expressionsniveau (siehe Abb. 6.29). Die starke TBX2-Expression der Klone #A6.7, #A6.13 und #A6.17 führte zu der Annahme, dass diese die pTRE3G-TBX2-Kassette in einen aktiven Genombereich integrierten. Von der Integration der Plasmide können auch wichtige zelluläre Funktionen wie das Wachstum betroffen sein. So limitierte das geringe Wachstum von #A6.17 die pro Experiment durchgeführte Anzahl an Wiederholungen. Zusätzlich führt eine Integration des Ziel-Gens in die Nähe von Heterochromatin zur Instabilität des Klones.^[214] Trotz stetiger Selektion war die TBX2-Expression nicht bei allen Klonen über die Zeit stabil. So wurden die Klone #A6.27 und #A6.30 bei einem Rescreening der TBX2-positiven Klone TBX2-negativ getestet (siehe Abb. 6.30). Zwar sollten die Zellen eines Klons genetisch identisch sein, oft aber werden klonale Zelllinien über die Zeit heterogen. Dies ist ein häufiges und unerwünschtes Problem bei der Etablierung stabiler Zelllinien.^[215] So hat auch die Wirtszelllinie COS-7 einen hypodiploiden Karyotyp mit 25 % Polyploidie (DSMZ, Beschreibung ACC60). Wurde TBX2 in die Nähe von Heterochromatin integriert, ist eine Inaktivierung über die Zeit wahrscheinlich.^[214] Zudem sind stabile Zelllinien häufig genomisch instabil, so dass die Fähigkeit zur TBX2-Expression infolge von Chromosomen-

strangbrüchen verloren gehen kann. Bei einem Wachstumsvorteil würden die TBX2-freien Zellen mit der Zeit die Zellpopulation dominieren. Da die Puromycinselektion überlebenden Zellen ca. fünfmal größer als die durchschnittlichen Zellen der Wirtszelllinie #A6.17 waren, scheiterte die Etablierung der dreifach stabilen Zelllinie womöglich aufgrund der durch die stabile Integration der Zielgen-DNA entstandenen genomischen Instabilität. Da sich die Zellgröße aus der zellulären Wachstums- sowie der Teilungsrate ergibt, ist eine Vergrößerung die offensichtlichste und beständigste Konsequenz einer Chromosomenvervielfältigung, der Ploidie. Polyploidie wird durch zahlreiche dramatische Defekte bei der Zellteilung verursacht.^[43,44] Da die Zellen sich nicht weiter teilen konnten, ist bei den Zellen infolge der stabilen Integration von drei Konstrukten von einer immensen Störung des Zellzyklus infolge genomischer Instabilität auszugehen. Infolge der repetitiven DNA-Sequenzen wurden die Chromosomen zunehmend instabil, weshalb Chromosomenstrangbrüche (DSB, Doppelstrangbruch) zunehmend wahrscheinlich wurden. Zwar werden DSBs zellulär durch NHEJ oder über homologe Rekombination (HR) repariert, doch das gehäufte Auftreten von DSBs begünstigt die genomische Instabilität dadurch, dass nicht reparierte DSBs schwerwiegende Genomveränderungen, wie ein Verlust der Heterozygotie, Aneuploidie, Deletionen oder Translokationen zur Folge haben.^[43,44] Ebenso führte die stabile ektopische Expression von *Tbx2* in Lungenfibroblastenzelllinien verstärkt zu Polyploidie.^[58] Hier wurden zwar alle uninduzierten Klone TBX2-negativ getestet (siehe Abb. 6.28 und 6.30), weshalb eine basale Aktivierung des TRE3G-Promotors ausgeschlossen wurde. Dennoch kann eine Polyploidie infolge einer basalen TBX2-Expression aufgrund der Detektionsschwellen der hier verwendeten Methoden nicht vollkommen ausgeschlossen werden.

7.2.3 Alternative Strategien

Die Zellen der stabilen Zelllinie haben die Selektion nach Transfektion des dritten Vektorkonstrukts p21-d2EGFP vermutlich aufgrund der durch die Integration repetitiver Sequenzen entstandenen genomischen Instabilität nicht überlebt. Die dreifache Selektionslast ließe sich vereinfachen, wenn zwei oder gar drei Komponenten in einem Vektor transfiziert würden. Da alle drei der hier verwendeten Komponenten einen eigenen Promotor benötigen (konstitutiv, tet und p21), ist der schon relativ häufig eingeschlagene Weg über einen polycistronischen Vektor, wie z.B. von Papapetrou *et al.*^[216] beschrieben, nicht

gangbar. Denkbar wäre das Zusammenfügen der drei Transkriptionseinheiten in einen Transfektionsvektor über die MultiSite Gateway Technologie (engl.: multi-gene delivery without co-transfection) von Invitrogen. Der modulare Konstruktionsmodus ermöglicht den einfachen Zusammenbau unterschiedlicher Varianten.

Da die TBX2-regulierte p21-Expression im transienten Luciferase-Reporterassay problemlos funktionierte (siehe Abb. 6.26 und 6.28), wäre es möglich auf die Generierung eines transienten Reporterassay-Systems zur Identifizierung TBX2-inhibierender Substanzen umzusteigen. Um die durch das kommerzielle Transfektionsmedium FuGENE HD entstehenden großen Kosten zu vermeiden, könnte auf alternative Transfektionsmethoden ausgewichen werden. Zu den kosteneffektiven Transfektionsmethoden zählen die chemische Calcium-Phosphat (CaPO_4)-Präzipitation sowie der Transfer von DNA in Säugerzellen mittels kationischen Polymeren, wie z.B. Polyethylenimine (PEI)^[209]. In beiden Fällen müssten die idealen Transfektionsbedingungen zuerst validiert werden. Da das transiente Reporterassay-System ohne Tet-On 3G-System funktioniert, müssten nur zwei Konstrukte in die Zelle eingeschleust werden. Sollte die Fluoreszenz als Read-out des Reportersystems dienen, wäre es notwendig, ein p21-Reporterkonstrukt mit einem stabileren Fluoreszenzmarker wie EGFP, maxGFP oder TurboGFP zu konstruieren und auf Eignung im Reportersystem zu überprüfen. Dies ist im Rahmen dieser Arbeit nicht gelungen. Durch die Signalverstärkung infolge der enzymatischen Substratumsetzung sind Luciferase-Reporterassays sensitiver als Fluoreszenz-basierte Assays.^[129] Ein unüberwindbarer Nachteil eines transienten Reporterassay-Systems wäre, dass transiente Transfektionen in diesem hohen Maßstab sehr zeitintensiv wären.

Ein schneller und effektiver Weg, DNA in die Wirtszellen zu schleusen, ist die virale Transfektion. Da Viren weder sich selbst replizieren können noch einen eigenen Stoffwechsel besitzen, sind sie hierbei von ihrer Wirtszelle abhängig. Dies wird bei der Entwicklung von viralen Vektor-Systemen ausgenutzt. Das virale Genom wird genetisch so modifiziert, dass potenzielle pathogene virale Gene durch das Transgen ersetzt werden (Produktionsvirus). Da die modifizierten Viren die Fähigkeit der autonomen Replikation verloren haben, ist ein Verpackungsvirus notwendig, der die Gene für die Hüllproteine enthält. Einkapselt im Verpackungsvirus wird der Produktionsvirus in die Wirtszelle eingeschleust. Allerdings werden nur Zellen mit Virus-spezifischen Rezeptoren transfiziert. Es existieren zahlreiche virale Systeme zur Transfektion von Säugerzellen, welche auch in der Gentherapie zum

Einsatz kommen.^[217] Die virale Transfektion ist auch zur stabilen Langzeitexpression geeignet, da die Vektoren stabil in das Wirtszellgenom integrieren oder als Episomen für lange Zeit im Zellkern verweilen. Zur stabilen Transfektion sind beispielsweise Retroviren wie MMLV geeignet. Da es sich hier um ein RNA-Virus handelt, erfolgt die Integration in das Wirtszellgenom als revers transkribierter Provirus. Der retrovirale Titer ist bei der retroviralen Transfektion sehr gering. Der Adeno-assoziierte Virus integriert an einer bestimmten Stelle des humanen Chromosoms 19, benötigt aber den Adenovirus als Verpackung. Lentiviren wie HIV-1, FIV und SIV gehören zur Unterklasse der Retroviren und eignen sich sowohl zur stabilen als auch transienten Transfektion. Lentiviren infizieren sowohl proliferierende als auch nicht proliferierende Zellen.^[217] Trotz vieler Vorteile hat die Generierung einer stabilen Zelllinie durch Viren auch einige Nachteile. So ist die Anzucht der Viren sehr zeitaufwendig. Aufgrund der häufigen Pathogenität viraler Systeme wird häufig ein S2-Labor benötigt. Zudem bietet die virale Hülle nur einen begrenzten Platz zur Aufnahme eines fremden Gens bei Aufrechterhaltung der Infektivität. Die Entwicklung einer Klonierungsstrategie zur Herstellung viraler Vektoren, die Klonierung und die Etablierung der viralen Transfektion sind sehr zeitintensiv und waren im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich.

8 Abkürzungsverzeichnis

β -Gal	β -Galaktosidase
aa	Aminosäure (engl.: amino acid)
Abb.	Abbildung
AP	Alkaline-Phosphatase
APPA	engl.: natriuretic peptide type A
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APT	Aminoglycosid-Phosphotransferase
ARF	engl.: alternative reading frame
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	engl.: bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
BRCA1/2	engl.: Breast cancer susceptibility-Gen 1/2
BS	Bindestelle
BSA	engl.: Bovine Serum Albumin
C	C-Terminus
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ca.	circa
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CDK	Cyclin-abhängige Kinasen
CDKN2A	engl.: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A
cDNA	engl.: complementary DNA
CHX	Cycloheximid
CMV	Zytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
CST-6	Cystatin-6
CtBP	C-terminales Bindeprotein

d2EGFP	engl.: destabilized enhanced GFP
D2-HDH	D-Isomer-spezifische 2-Hydroxysäure Dehydrogenase
ddH ₂ O	Doppelt deionisiertes Wasser
dEGFP (dCFP; dYFP)	engl.: destabilized enhanced GFP (CFP; YFP)
dest.	destilliert
DIG	Digoxigenin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynucleotide
Dox	Doxyzyklin
Dpp	Decapentaplegic
<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
E(spl)-C	engl.: Enhancer of split complex
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECFP	engl.: enhanced cyan fluorescent protein
EDTA	engl.: Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	engl.: enhanced GFP
EGR1	engl.: early growth response 1
EMSA	Elektro Mobility Shift Assay
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transformation
EYFP	engl.: Enhanced yellow fluorescent protein
FACS	engl.: Fluorescence associated cell sorting
FCS	Fötale Kälber Serum (engl.: Fetal Calf Serum)
FLuc	Firefly-Luciferase
fs	frame-shift
G418	Genitizin
GFP	Grün Fluoreszentes Protein
GLuc	Gaussia-Luciferase
Gro	Groucho
GroBS	Gro-Bindestelle

GST	Glutathion-S-Transferase
HDAC	engl.: Histon Deacetylase
HNSCC	engl.: head and neck squamous cell carcinoma
HDS	Hochdurchsatzscreening
hph	Hygromycin-Phosphotransferase
HR	Homologe Rekombination
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: horseradish peroxidase)
Hs	Homo sapiens
HygB	Hygromyzin B
ICGC	engl.: International Cancer Genome Consortium
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Kontr.	Kontrolle
LALA	M302A/V304A (TBX3) bzw. L294A/L296A (TBX2)
LB	Luria Bertani (hier: Luria Miller)
log	Logarithmus
Luc	Luciferase
M	Molar
MAPK	engl.: mitogen-activated protein kinase
MCS	engl.: multiple cloning site
MDM2	engl.: Murine double minute 2
MEF	engl.: mouse embryonic fibroblast
MFI	engl.: Mean of fluorescent intensity
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mind.	mindestens
N	N-Terminus
n.d.	nicht detektiert
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NDRG1	engl.: N-myc downregulated gene 1

NHEJ	nicht homologes End-Joining
NKX2.5	NK2 homeobox 5
NLS	Kernlokalisationsignal
NRAGE	engl.: eutrophin receptor-interacting melanoma antigen
OD	optische Dichte
Omb	Optomotor-blind
ORF	engl.: Open reading frame
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	engl.: Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimine
PEST	Prolin, Glutamin, Serin, Threonin
PI3K	Phosphatidylinositid-3-Kinase
PK	Proteinkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly(dI-dC)	engl.: poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic)
PP	Phosphatase
PS	Penizillin/Streptomycin
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
PTM	posttranslationale Modifikationen
Puro	Puromycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rb	Retinoblastoma Protein
Ref (=RZB)	Relative Zentrifugalbeschleunigung
RD	Repressordomäne
RLU	engl.: Relative Light Units
RLuc	Renilla-Luciferase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	engl.: revolutions per minute
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real-Time-PCR
SAE	SUMO aktivierendes Enzym

SD	Standardabweichung (engl.: Standard Deviation)
SDS	engl.: sodium dodecyl sulfate
SIM	SUMO-Interaktionsmotiv
siRNA	engl.: small interfering RNA
SMG	Signifikant mutiertes Gen
SOB	engl.: Super Optimal Broth
sog.	sogenannte
SSP	SUMO spezifische Protease
SUMO	engl.: small ubiquitin-like modifier
T	Brachyury
Tab.	Tabelle
TBE	T-box-Bindeelement
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	engl.: tris-buffered saline
TBS-T	TBS mit Tween20
TBX	T-box
TBX2dm	TBX2-Doppelmutante
TBX3dm	TBX3-Doppelmutante
TCGA	engl.: The Cancer Genome Atlas
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
Tet	Tetrazyklin
TetO	Tet-Operator
TF	Transkriptionsfaktor
TGF	engl.: Transforming growth factor
TK	Thymidin Kinase
TLE	engl.: transducin-like enhancer of split
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tub	Tubulin
U	Units
UBC9	engl.: ubiquitin conjugating enzyme 9
UMS	Ulna-Mamma Syndrom

US	engl.: United States
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen

9 Literaturverzeichnis

- [1] P. J. Stephens, P. S. Tarpey, H. Davies, P. Van Loo, C. Greenman, D. C. Wedge, S. Nik-Zainal, S. Martin, I. Varela, G. R. Bignell, L. R. Yates, E. Papaemmanuil, D. Beare, A. Butler, A. Cheverton, J. Gamble, J. Hinton, M. Jia, A. Jayakumar, D. Jones, C. Latimer, K. W. Lau, S. McLaren, D. J. McBride, A. Menzies, L. Mudie, K. Raine, R. Rad, M. S. Chapman, J. Teague, D. Easton, A. Langerød, O. B. C. C. O. S. B. R. E. A. C. , M. T. M. Lee, C.-Y. Shen, B. T. K. Tee, B. W. Huimin, A. Broeks, A. C. Vargas, G. Turashvili, J. Martens, A. Fatima, P. Miron, S.-F. Chin, G. Thomas, S. Boyault, O. Mariani, S. R. Lakhani, M. van de Vijver, L. van 't Veer, J. Foekens, C. Desmedt, C. Sotiriou, A. Tutt, C. Caldas, J. S. Reis-Filho, S. A. J. R. Aparicio, A. V. Salomon, A.-L. Børresen-Dale, A. L. Richardson, P. J. Campbell, P. A. Futreal, M. R. Stratton. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* **2012**, *486*, 400–404.
- [2] V. Wilson, F. L. Conlon. The T-box family. *Genome Biol* **2002**, *3*, REVIEWS3008.
- [3] S. Carreira, T. J. Dexter, U. Yavuzer, D. J. Easty, C. R. Goding. Brachyury-related transcription factor Tbx2 and repression of the melanocyte-specific TRP-1 promoter. *Mol Cell Biol* **1998**, *18*, 5099–5108.
- [4] T. K. Ghosh, E. A. Packham, A. J. Bonser, T. E. Robinson, S. J. Cross, J. D. Brook. Characterization of the TBX5 binding site and analysis of mutations that cause Holt-Oram syndrome. *Hum Mol Genet* **2001**, *10*, 1983–1994.
- [5] M. E. Lingbeek, J. J. L. Jacobs, M. van Lohuizen. The T-box repressors TBX2 and TBX3 specifically regulate the tumor suppressor gene p14ARF via a variant T-site in the initiator. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 26120–26127.

-
- [6] F. L. Conlon, L. Fairclough, B. M. Price, E. S. Casey, J. C. Smith. Determinants of T box protein specificity. *Development* **2001**, *128*, 3749–3758.
- [7] C. W. Müller, B. G. Herrmann. Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the Brachyury transcription factor. *Nature* **1997**, *389*, 884–888.
- [8] M. Coll, J. G. Seidman, C. W. Müller. Structure of the DNA-bound T-box domain of human TBX3, a transcription factor responsible for ulnar-mammary syndrome. *Structure* **2002**, *10*, 343–356.
- [9] F. A. Stennard, M. W. Costa, D. A. Elliott, S. Rankin, S. J. P. Haast, D. Lai, L. P. A. McDonald, K. Niederreither, P. Dolle, B. G. Bruneau, A. M. Zorn, R. P. Harvey. Cardiac T-box factor Tbx20 directly interacts with Nkx2-5, GATA4, and GATA5 in regulation of gene expression in the developing heart. *Dev Biol* **2003**, *262*, 206–224.
- [10] C. Paxton, H. Zhao, Y. Chin, K. Langner, J. Reecy. Murine Tbx2 contains domains that activate and repress gene transcription. *Gene* **2002**, *283*, 117–124.
- [11] B. G. Herrmann, S. Labeit, A. Poustka, T. R. King, H. Lehrach. Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* **1990**, *343*, 617–622.
- [12] G. O. Pflugfelder, H. Roth, B. Poeck. A homology domain shared between Drosophila optomotor-blind and mouse Brachyury is involved in DNA binding. *Biochem Biophys Res Commun* **1992**, *186*, 918–925.
- [13] R. J. Bollag, Z. Siegfried, J. A. Cebra-Thomas, N. Garvey, E. M. Davison, L. M. Silver. An ancient family of embryonically expressed mouse genes sharing a conserved protein motif with the T locus. *Nat Genet* **1994**, *7*, 383–389.
- [14] A. Kispert, B. Koschorz, B. G. Herrmann. The T protein encoded by Brachyury is a tissue-specific transcription factor. *EMBO J* **1995**, *14*, 4763–4772.
- [15] L. A. Naiche, Z. Harrelson, R. G. Kelly, V. E. Papaioannou. T-box genes in vertebrate development. *Annu Rev Genet* **2005**, *39*, 219–239.
- [16] S. I. Agulnik, N. Garvey, S. Hancock, I. Ruvinsky, D. L. Chapman, I. Agulnik, R. Bollag, V. Papaioannou, L. M. Silver. Evolution of mouse T-box genes by tandem duplication and cluster dispersion. *Genetics* **1996**, *144*, 249–254.

- [17] V. E. Papaioannou. T-box genes in development: from hydra to humans. *Int Rev Cytol* **2001**, *207*, 1–70.
- [18] N. Takatori, K. Hotta, Y. Mochizuki, G. Satoh, Y. Mitani, N. Satoh, Y. Satou, H. Takahashi. T-box genes in the ascidian *Ciona intestinalis*: characterization of cDNAs and spatial expression. *Dev Dyn* **2004**, *230*, 743–753.
- [19] F. Greulich, C. Rudat, A. Kispert. Mechanisms of T-box gene function in the developing heart. *Cardiovasc Res* **2011**, *91*, 212–222.
- [20] V. E. Papaioannou, L. M. Silver. The T-box gene family. *Bioessays* **1998**, *20*, 9–19.
- [21] M. Rowley, E. Grothey, F. J. Couch. The role of Tbx2 and Tbx3 in mammary development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **2004**, *9*, 109–118.
- [22] E. A. Packham, J. D. Brook. T-box genes in human disorders. *Hum Mol Genet* **2003**, *12 Spec No 1*, R37–R44.
- [23] M. Bamshad, R. C. Lin, D. J. Law, W. C. Watkins, P. A. Krakowiak, M. E. Moore, P. Franceschini, R. Lala, L. B. Holmes, T. C. Gebuhr, B. G. Bruneau, A. Schinzel, J. G. Seidman, C. E. Seidman, L. B. Jorde. Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nat Genet* **1997**, *16*, 311–315.
- [24] M. Bamshad, T. Le, W. S. Watkins, M. E. Dixon, B. E. Kramer, A. D. Roeder, J. C. Carey, S. Root, A. Schinzel, L. Van Maldergem, R. J. Gardner, R. C. Lin, C. E. Seidman, J. G. Seidman, R. Wallerstein, E. Moran, R. Sutphen, C. E. Campbell, L. B. Jorde. The spectrum of mutations in TBX3: Genotype/Phenotype relationship in ulnar-mammary syndrome. *Am J Hum Genet* **1999**, *64*, 1550–1562.
- [25] E. M. H. F. Bongers, P. H. G. Duijf, S. E. M. van Beersum, J. Schoots, A. Van Kampen, A. Burckhardt, B. C. J. Hamel, F. Losan, L. H. Hoefsloot, H. G. Yntema, N. V. A. M. Knoers, H. van Bokhoven. Mutations in the human TBX4 gene cause small patella syndrome. *Am J Hum Genet* **2004**, *74*, 1239–1248.

- [26] Q. Y. Li, R. A. Newbury-Ecob, J. A. Terrett, D. I. Wilson, A. R. Curtis, C. H. Yi, T. Gebuhr, P. J. Bullen, S. C. Robson, T. Strachan, D. Bonnet, S. Lyonnet, I. D. Young, J. A. Raeburn, A. J. Buckler, D. J. Law, J. D. Brook. Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet* **1997**, *15*, 21–29.
- [27] S. Wansleben, J. Peres, S. Hare, C. R. Goding, S. Prince. T-box transcription factors in cancer biology. *Biochim Biophys Acta* **2014**, *1846*, 380–391.
- [28] B. C. Ballif, A. Theisen, J. A. Rosenfeld, R. N. Traylor, J. Gastier-Foster, D. L. Thrush, C. Astbury, D. Bartholomew, K. L. McBride, R. E. Pyatt, K. Shane, W. E. Smith, V. Banks, W. B. Gallentine, P. Brock, M. K. Rudd, M. P. Adam, J. A. Keene, J. A. Phillips, 3rd, J. P. Pfothauer, G. C. Gowans, P. Stankiewicz, B. A. Bejjani, L. G. Shaffer. Identification of a recurrent microdeletion at 17q23.1q23.2 flanked by segmental duplications associated with heart defects and limb abnormalities. *Am J Hum Genet* **2010**, *86*, 454–461.
- [29] M. Nimmakayalu, H. Major, V. Sheffield, D. H. Solomon, R. J. Smith, S. R. Patil, O. A. Shchelochkov. Microdeletion of 17q22q23.2 encompassing TBX2 and TBX4 in a patient with congenital microcephaly, thyroid duct cyst, sensorineural hearing loss, and pulmonary hypertension. *Am J Med Genet A* **2011**, *155A*, 418–423.
- [30] S. Sinha, S. Abraham, R. M. Gronostajski, C. E. Campbell. Differential DNA binding and transcription modulation by three T-box proteins, T, TBX1 and TBX2. *Gene* **2000**, *258*, 15–29.
- [31] M. Porsch, K. Hofmeyer, B. S. Bausenwein, S. Grimm, B. H. Weber, R. Miassod, G. O. Pflugfelder. Isolation of a Drosophila T-box gene closely related to human TBX1. *Gene* **1998**, *212*, 237–248.
- [32] H. Carlson, S. Ota, C. E. Campbell, P. J. Hurlin. A dominant repression domain in Tbx3 mediates transcriptional repression and cell immortalization: relevance to mutations in Tbx3 that cause ulnar-mammary syndrome. *Hum Mol Genet* **2001**, *10*, 2403–2413.

- [33] W. M. H. Hoogaars, A. Engel, J. F. Brons, A. O. Verkerk, F. J. de Lange, L. Y. E. Wong, M. L. Bakker, D. E. Clout, V. Wakker, P. Barnett, J. H. Ravesloot, A. F. M. Moorman, E. E. Verheijck, V. M. Christoffels. Tbx3 controls the sinoatrial node gene program and imposes pacemaker function on the atria. *Genes Dev* **2007**, *21*, 1098–1112.
- [34] Z. C. D’Costa, C. Higgins, C. W. Ong, G. W. Irwin, D. Boyle, D. G. McArt, K. McCloskey, N. E. Buckley, N. T. Crawford, L. Thiagarajan, J. T. Murray, R. D. Kennedy, K. A. Mulligan, D. P. Harkin, D. J. J. Waugh, C. J. Scott, M. Salto-Tellez, R. Williams, P. B. Mullan. TBX2 represses CST6 resulting in uncontrolled legumain activity to sustain breast cancer proliferation: a novel cancer-selective target pathway with therapeutic opportunities. *Oncotarget* **2014**, *5*, 1609–1620.
- [35] J. J. Jacobs, P. Keblusek, E. Robanus-Maandag, P. Kristel, M. Lingbeek, P. M. Nederlof, T. van Welsem, M. J. van de Vijver, E. Y. Koh, G. Q. Daley, M. van Lohuizen. Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nat Genet* **2000**, *26*, 291–299.
- [36] S. Prince, S. Carreira, K. W. Vance, A. Abrahams, C. R. Goding. Tbx2 directly represses the expression of the p21(WAF1) cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cancer Res* **2004**, *64*, 1669–1674.
- [37] T. R. Brummelkamp, R. M. Kortlever, M. Lingbeek, F. Trettel, M. E. MacDonald, M. van Lohuizen, R. Bernards. TBX-3, the gene mutated in Ulnar-Mammary Syndrome, is a negative regulator of p19ARF and inhibits senescence. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 6567–6572.
- [38] J. E. Talmadge, I. J. Fidler. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* **2010**, *70*, 5649–5669.
- [39] P. Anand, A. B. Kunnumakkara, A. B. Kunnumakara, C. Sundaram, K. B. Harikumar, S. T. Tharakan, O. S. Lai, B. Sung, B. B. Aggarwal. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm Res* **2008**, *25*, 2097–2116.
- [40] P. S. Moore, Y. Chang. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer* **2010**, *10*, 878–889.

- [41] J. B. Liao. Viruses and human cancer. *Yale J Biol Med* **2006**, *79*, 115–122.
- [42] R. A. Pagon, M. P. Adam, T. D. Bird, C. R. Dolan, C.-T. Fong, R. J. Smith, K. Stephens, N. Petrucelli, M. B. Daly, G. L. Feldman. BRCA1 and BRCA2 Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Gene Reviews* **2013**.
- [43] Z. Storchova, D. Pellman. From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**, *5*, 45–54.
- [44] W. M. Abdel-Rahman. Genomic instability and carcinogenesis: an update. *Curr Genomics* **2008**, *9*, 535–541.
- [45] D. P. Cahill, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, C. Lengauer. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* **1999**, *9*, M57–M60.
- [46] D. Hanahan, R. A. Weinberg. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
- [47] T. Sjöblom, S. Jones, L. D. Wood, D. W. Parsons, J. Lin, T. D. Barber, D. Mandelker, R. J. Leary, J. Ptak, N. Silliman, S. Szabo, P. Buckhaults, C. Farrell, P. Meeh, S. D. Markowitz, J. Willis, D. Dawson, J. K. V. Willson, A. F. Gazdar, J. Hartigan, L. Wu, C. Liu, G. Parmigiani, B. H. Park, K. E. Bachman, N. Papadopoulos, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* **2006**, *314*, 268–274.
- [48] B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. A. Diaz, Jr, K. W. Kinzler. Cancer genome landscapes. *Science* **2013**, *339*, 1546–1558.
- [49] R. A. Weinberg. The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Ann N Y Acad Sci* **1995**, *758*, 331–338.
- [50] M. Olivier, M. Hollstein, P. Hainaut. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2010**, *2*, a001008.
- [51] J. Lu, X.-P. Li, Q. Dong, H.-F. Kung, M.-L. He. TBX2 and TBX3: the special value for anticancer drug targets. *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1806*, 268–274.

- [52] L. E. Kelemen, X. Wang, Z. S. Fredericksen, V. S. Pankratz, P. D. P. Pharoah, S. Ahmed, A. M. Dunning, D. F. Easton, R. A. Vierkant, J. R. Cerhan, E. L. Goode, J. E. Olson, F. J. Couch. Genetic variation in the chromosome 17q23 amplicon and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2009**, *18*, 1864–1868.
- [53] K. W. Vance, S. Carreira, G. Brosch, C. R. Goding. Tbx2 is overexpressed and plays an important role in maintaining proliferation and suppression of senescence in melanomas. *Cancer Res* **2005**, *65*, 2260–2268.
- [54] C. Campbell, K. Goodrich, G. Casey, B. Beatty. Cloning and mapping of a human gene (TBX2) sharing a highly conserved protein motif with the Drosophila omb gene. *Genomics* **1995**, *28*, 255–260.
- [55] E. H. Mahlamäki, M. Bärlund, M. Tanner, L. Gorunova, M. Höglund, R. Karhu, A. Kallioniemi. Frequent amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **2002**, *35*, 353–358.
- [56] C. S. Sinclair, C. Adem, A. Naderi, C. L. Soderberg, M. Johnson, K. Wu, L. Wadum, V. L. Couch, T. A. Sellers, D. Schaid, J. Slezak, Z. Fredericksen, J. N. Ingle, L. Hartmann, R. B. Jenkins, F. J. Couch. TBX2 is preferentially amplified in BRCA1- and BRCA2-related breast tumors. *Cancer Res* **2002**, *62*, 3587–3591.
- [57] Y. Han, W.-W. Tu, Y.-G. Wen, D.-W. Yan, G.-Q. Qiu, Z.-H. Peng, C.-Z. Zhou. Increased expression of TBX2 is a novel independent prognostic biomarker of a worse outcome in colorectal cancer patients after curative surgery and a potential therapeutic target. *Med Oncol* **2013**, *30*, 688.
- [58] E. Davis, H. Teng, B. Bilican, M. I. Parker, B. Liu, S. Carriera, C. R. Goding, S. Prince. Ectopic Tbx2 expression results in polyploidy and cisplatin resistance. *Oncogene* **2008**, *27*, 976–984.
- [59] C. J. Sherr, J. D. Weber. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* **2000**, *10*, 94–99.
- [60] A. J. Levine, W. Hu, Z. Feng. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* **2006**, *13*, 1027–1036.

- [61] K. Löhr, C. Möritz, A. Contente, M. Dobbelstein. p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 32507–32516.
- [62] A. M. Goldstein. Familial melanoma, pancreatic cancer and germline CDKN2A mutations. *Hum Mutat* **2004**, *23*, 630.
- [63] H. Tsao, L. Chin, L. A. Garraway, D. E. Fisher. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev* **2012**, *26*, 1131–1155.
- [64] K. W. Vance, H. M. Shaw, M. Rodriguez, S. Ott, C. R. Goding. The retinoblastoma protein modulates Tbx2 functional specificity. *Mol Biol Cell* **2010**, *21*, 2770–2779.
- [65] P. Paoli, E. Giannoni, P. Chiarugi. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1833*, 3481–3498.
- [66] J. Zavadil, J. Haley, R. Kalluri, S. K. Muthuswamy, E. Thompson. Epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* **2008**, *68*, 9574–9577.
- [67] R. Kalluri, R. A. Weinberg. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* **2009**, *119*, 1420–1428.
- [68] S. Kumar, S. H. Park, B. Cieply, J. Schupp, E. Killiam, F. Zhang, D. L. Rimm, S. M. Frisch. A pathway for the control of anoikis sensitivity by E-cadherin and epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* **2011**, *31*, 4036–4051.
- [69] K. L. Redmond, N. T. Crawford, H. Farmer, Z. C. D’Costa, G. J. O’Brien, N. E. Buckley, R. D. Kennedy, P. G. Johnston, D. P. Harkin, P. B. Mullan. T-box 2 represses NDRG1 through an EGR1-dependent mechanism to drive the proliferation of breast cancer cells. *Oncogene* **2010**, *29*, 3252–3262.
- [70] B. Wang, L. E. Lindley, V. Fernandez-Vega, M. E. Rieger, A. H. Sims, K. J. Briegel. The T box transcription factor TBX2 promotes epithelial-mesenchymal transition and invasion of normal and malignant breast epithelial cells. *PLoS One* **2012**, *7*, e41355.
- [71] M. Rodriguez, E. Aladowicz, L. Lanfrancone, C. R. Goding. Tbx3 represses E-cadherin expression and enhances melanoma invasiveness. *Cancer Res* **2008**, *68*, 7872–7881.

- [72] J. Peres, E. Davis, S. Mowla, D. C. Bennett, J. A. Li, S. Wansleben, S. Prince. The Highly Homologous T-Box Transcription Factors, TBX2 and TBX3, Have Distinct Roles in the Oncogenic Process. *Genes Cancer* **2010**, *1*, 272–282.
- [73] J. Peres, S. Prince. The T-box transcription factor, TBX3, is sufficient to promote melanoma formation and invasion. *Mol Cancer* **2013**, *12*, 117.
- [74] D. Burgucu, K. Guney, D. Sahinturk, I. H. Ozbudak, D. Ozel, G. Ozbilim, U. Yavuzer. Tbx3 represses PTEN and is over-expressed in head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* **2012**, *12*, 481.
- [75] L. S. Steelman, W. H. Chappell, S. L. Abrams, R. C. Kempf, J. Long, P. Laidler, S. Mijatovic, D. Maksimovic-Ivanic, F. Stivala, M. C. Mazzarino, M. Donia, P. Fagone, G. Malaponte, F. Nicoletti, M. Libra, M. Milella, A. Tafuri, A. Bonati, J. Bäsecke, L. Cocco, C. Evangelisti, A. M. Martelli, G. Montalto, M. Cervello, J. A. McCubrey. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)* **2011**, *3*, 192–222.
- [76] N. D. Dees, Q. Zhang, C. Kandoth, M. C. Wendl, W. Schierding, D. C. Koboldt, T. B. Mooney, M. B. Callaway, D. Dooling, E. R. Mardis, R. K. Wilson, L. Ding. MuSiC: identifying mutational significance in cancer genomes. *Genome Res* **2012**, *22*, 1589–1598.
- [77] C. Kandoth, M. D. McLellan, F. Vandin, K. Ye, B. Niu, C. Lu, M. Xie, Q. Zhang, J. F. McMichael, M. A. Wyczalkowski, M. D. M. Leiserson, C. A. Miller, J. S. Welch, M. J. Walter, M. C. Wendl, T. J. Ley, R. K. Wilson, B. J. Raphael, L. Ding. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **2013**, *502*, 333–339.
- [78] T. M. Karve, A. K. Cheema. Small changes huge impact: the role of protein post-translational modifications in cellular homeostasis and disease. *J Amino Acids* **2011**, *2011*, 207691.
- [79] A. S. Venne, L. Kollipara, R. P. Zahedi. The next level of complexity: crosstalk of posttranslational modifications. *Proteomics* **2014**, *14*, 513–524.

- [80] S. P. Jackson, D. Durocher. Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO. *Mol Cell* **2013**, *49*, 795–807.
- [81] J. A. Ubersax, J. E. Ferrell, Jr. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8*, 530–541.
- [82] L. N. Johnson. The regulation of protein phosphorylation. *Biochem Soc Trans* **2009**, *37*, 627–641.
- [83] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, *298*, 1912–1934.
- [84] D. K. Morrison. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2012**, *4*.
- [85] D. O. Morgan. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **1997**, *13*, 261–291.
- [86] K. I. Nakayama, K. Nakayama. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* **2006**, *6*, 369–381.
- [87] T. Evans, E. T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel, T. Hunt. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **1983**, *33*, 389–396.
- [88] A. Hershko. Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* **1997**, *9*, 788–799.
- [89] R. A. Weinberg. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **1995**, *81*, 323–330.
- [90] J. W. Harbour. Tumor suppressor genes in ophthalmology. *Surv Ophthalmol* **1999**, *44*, 235–246.
- [91] J. Zhao. Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell Mol Life Sci* **2007**, *64*, 3017–3033.
- [92] K. Shuai, B. Liu. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2005**, *5*, 593–605.

- [93] D. Owerbach, E. M. McKay, E. T. H. Yeh, K. H. Gabbay, K. M. Bohren. A proline-90 residue unique to SUMO-4 prevents maturation and sumoylation. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *337*, 517–520.
- [94] W. Wei, P. Yang, J. Pang, S. Zhang, Y. Wang, M.-H. Wang, Z. Dong, J.-X. She, C.-Y. Wang. A stress-dependent SUMO4 sumoylation of its substrate proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, *375*, 454–459.
- [95] M. S. Rodriguez, C. Dargemont, R. T. Hay. SUMO-1 conjugation in vivo requires both a consensus modification motif and nuclear targeting. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 12654–12659.
- [96] O. Kerscher. SUMO junction-what's your function? New insights through SUMO-interacting motifs. *EMBO Rep* **2007**, *8*, 550–555.
- [97] V. Dorval, P. E. Fraser. SUMO on the road to neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* **2007**, *1773*, 694–706.
- [98] J. Turner, M. Crossley. The CtBP family: enigmatic and enzymatic transcriptional co-repressors. *Bioessays* **2001**, *23*, 683–690.
- [99] M. Buscarlet, S. Stifani. The 'Marx' of Groucho on development and disease. *Trends Cell Biol* **2007**, *17*, 353–361.
- [100] B. H. Jennings, D. Ish-Horowicz. The Groucho/TLE/Grg family of transcriptional co-repressors. *Genome Biol* **2008**, *9*, 205.
- [101] S. Artavanis-Tsakonas, C. Delidakis, R. G. Fehon. The Notch locus and the cell biology of neuroblast segregation. *Annu Rev Cell Biol* **1991**, *7*, 427–452.
- [102] J. A. Campos-Ortega, Y. N. Jan. Genetic and molecular bases of neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Neurosci* **1991**, *14*, 399–420.
- [103] J. A. Campos-Ortega. Genetic mechanisms of early neurogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Neurobiol* **1995**, *10*, 75–89.
- [104] S. Stifani, C. M. Blaumueller, N. J. Redhead, R. E. Hill, S. Artavanis-Tsakonas. Human homologs of a *Drosophila* Enhancer of split gene product define a novel family of nuclear proteins. *Nat Genet* **1992**, *2*, 343.

-
- [105] Z. Paroush, R. Finley, Jr, T. Kidd, S. M. Wainwright, P. W. Ingham, R. Brent, D. Ish-Horowicz. Groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell* **1994**, *79*, 805–815.
- [106] A. J. Courey, S. Jia. Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes Dev* **2001**, *15*, 2786–2796.
- [107] A. Kaul, E. Schuster, B. H. Jennings. The Groucho co-repressor is primarily recruited to local target sites in active chromatin to attenuate transcription. *PLoS Genet* **2014**, *10*, e1004595.
- [108] G. Chen, J. Fernandez, S. Mische, A. J. Courey. A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev* **1999**, *13*, 2218–2230.
- [109] L. M. Pickles, S. M. Roe, E. J. Hemingway, S. Stifani, L. H. Pearl. Crystal structure of the C-terminal WD40 repeat domain of the human Groucho/TLE1 transcriptional corepressor. *Structure* **2002**, *10*, 751–761.
- [110] G. Chinnadurai. Transcriptional regulation by C-terminal binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol* **2007**, *39*, 1593–1607.
- [111] N. Katsanis, E. M. Fisher. A novel C-terminal binding protein (CTBP2) is closely related to CTBP1, an adenovirus E1A-binding protein, and maps to human chromosome 21q21.3. *Genomics* **1998**, *47*, 294–299.
- [112] J. M. Boyd, T. Subramanian, U. Schaeper, M. La Regina, S. Bayley, G. Chinnadurai. A region in the C-terminus of adenovirus 2/5 E1a protein is required for association with a cellular phosphoprotein and important for the negative modulation of T24-ras mediated transformation, tumorigenesis and metastasis. *EMBO J* **1993**, *12*, 469–478.
- [113] U. Schaeper, J. M. Boyd, S. Verma, E. Uhlmann, T. Subramanian, G. Chinnadurai. Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1995**, *92*, 10467–10471.

- [114] Y. Nibu, H. Zhang, M. Levine. Interaction of short-range repressors with *Drosophila* CtBP in the embryo. *Science* **1998**, *280*, 101–104.
- [115] G. Chinnadurai. The transcriptional corepressor CtBP: a foe of multiple tumor suppressors. *Cancer Res* **2009**, *69*, 731–734.
- [116] C. N. Birts, R. Harding, G. Soosaipillai, T. Halder, A. Azim-Araghi, M. Darley, R. I. Cutress, A. C. Bateman, J. P. Blaydes. Expression of CtBP family protein isoforms in breast cancer and their role in chemoresistance. *Biol Cell* **2010**, *103*, 1–19.
- [117] J. S. Byun, K. Gardner. C-Terminal Binding Protein: A Molecular Link between Metabolic Imbalance and Epigenetic Regulation in Breast Cancer. *Int J Cell Biol* **2013**, *2013*, 647975.
- [118] M. L. Grootclaes, S. M. Frisch. Evidence for a function of CtBP in epithelial gene regulation and anoikis. *Oncogene* **2000**, *19*, 3823–3828.
- [119] M. Grootclaes, Q. Deveraux, J. Hildebrand, Q. Zhang, R. H. Goodman, S. M. Frisch. C-terminal-binding protein corepresses epithelial and proapoptotic gene expression programs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 4568–4573.
- [120] T. Efferth, V. B. Konkimalla, Y.-F. Wang, A. Sauerbrey, S. Meinhardt, F. Zintl, J. Mattern, M. Volm. Prediction of broad spectrum resistance of tumors towards anticancer drugs. *Clin Cancer Res* **2008**, *14*, 2405–2412.
- [121] T. Efferth, P. C. H. Li, V. S. B. Konkimalla, B. Kaina. From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy. *Trends Mol Med* **2007**, *13*, 353–361.
- [122] T. Efferth, S. Kahl, K. Paulus, M. Adams, R. Rauh, H. Boechzelt, X. Hao, B. Kaina, R. Bauer. Phytochemistry and pharmacogenomics of natural products derived from traditional Chinese medicine and Chinese materia medica with activity against tumor cells. *Mol Cancer Ther* **2008**, *7*, 152–161.
- [123] D. J. Newman, G. M. Cragg. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* **2007**, *70*, 461–477.
- [124] P. H. Abelson. Medicine from plants. *Science* **1990**, *247*, 513.

- [125] M. Wink. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. *Theoretical and Applied Genetics* **1988**, *75*, 225–233.
- [126] L. H. Naylor. Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochem Pharmacol* **1999**, *58*, 749–757.
- [127] T. Jiang, B. Xing, J. Rao. Recent developments of biological reporter technology for detecting gene expression. *Biotechnol Genet Eng Rev* **2008**, *25*, 41–75.
- [128] I. Bronstein, J. Fortin, P. E. Stanley, G. S. Stewart, L. J. Kricka. Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. *Anal Biochem* **1994**, *219*, 169–181.
- [129] N. Thorne, J. Inglese, D. S. Auld. Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. *Chem Biol* **2010**, *17*, 646–657.
- [130] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **1992**, *111*, 229–233.
- [131] R. N. Day, M. W. Davidson. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chem Soc Rev* **2009**, *38*, 2887–2921.
- [132] S. J. Remington. Green fluorescent protein: a perspective. *Protein Sci* **2011**, *20*, 1509–1519.
- [133] Zhang, Chung, Oldenburg. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* **1999**, *4*, 67–73.
- [134] K. P. Mishra, L. Ganju, M. Sairam, P. K. Banerjee, R. C. Sawhney. A review of high throughput technology for the screening of natural products. *Biomed Pharmacother* **2008**, *62*, 94–98.
- [135] M. Gossen, H. Bujard. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, *89*, 5547–5551.
- [136] M. Gossen, S. Freundlieb, G. Bender, G. Müller, W. Hillen, H. Bujard. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **1995**, *268*, 1766–1769.

- [137] Y.-B. Lee, C. P. J. Glover, A. S. Cosgrave, A. Bienemann, J. B. Uney. Optimizing regulatable gene expression using adenoviral vectors. *Exp Physiol* **2005**, *90*, 33–37.
- [138] W. Fan, X. Huang, C. Chen, J. Gray, T. Huang. TBX3 and its isoform TBX3+2a are functionally distinctive in inhibition of senescence and are overexpressed in a subset of breast cancer cell lines. *Cancer Res* **2004**, *64*, 5132–5139.
- [139] W. Yarosh, T. Barrientos, T. Esmailpour, L. Lin, P. M. Carpenter, K. Osann, H. Anton-Culver, T. Huang. TBX3 is overexpressed in breast cancer and represses p14 ARF by interacting with histone deacetylases. *Cancer Res* **2008**, *68*, 693–699.
- [140] N. C. Douglas, V. E. Papaioannou. The T-box transcription factors TBX2 and TBX3 in mammary gland development and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **2013**, *18*, 143–147.
- [141] N. V. Butz, C. E. Campbell, R. M. Gronostajski. Differential target gene activation by TBX2 and TBX2VP16: evidence for activation domain-dependent modulation of gene target specificity. *Gene* **2004**, *342*, 67–76.
- [142] A. Legler. Entwicklung von TBX2- und TBX3-Expressionsvektoren zur Identifizierung molekularer und genetischer Determinanten verstärkät. *Diplomarbeit* **2009**.
- [143] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **1985**, *230*, 1350–1354.
- [144] R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, H. A. Erlich. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **1988**, *239*, 487–491.
- [145] C. C. Uphoff, H. G. Drexler. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **2002**, *38*, 79–85.
- [146] S. Razin, D. Yogev, Y. Naot. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* **1998**, *62*, 1094–1156.

- [147] R. B. Helling, H. M. Goodman, H. W. Boyer. Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol* **1974**, *14*, 1235–1244.
- [148] F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**, *74*, 5463–5467.
- [149] R. Higuchi, C. Fockler, G. Dollinger, R. Watson. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **1993**, *11*, 1026–1030.
- [150] H. R. Griffin, A. Töpf, E. Glen, C. Zweier, A. G. Stuart, J. Parsons, I. Peart, J. Deanfield, J. O’Sullivan, A. Rauch, P. Scambler, J. Burn, H. J. Cordell, B. Keavney, J. A. Goodship. Systematic survey of variants in TBX1 in non-syndromic tetralogy of Fallot identifies a novel 57 base pair deletion that reduces transcriptional activity but finds no evidence for association with common variants. *Heart* **2010**, *96*, 1651–1655.
- [151] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248–254.
- [152] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J. D. Thompson, D. G. Higgins. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* **2011**, *7*, 539.
- [153] B. Reva, Y. Antipin, C. Sander. Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Res* **2011**, *39*, e118.
- [154] A. Kispert, B. G. Herrmann. The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J* **1993**, *12*, 3211–3220.
- [155] W. M. H. Hoogaars, P. Barnett, M. Rodriguez, D. E. Clout, A. F. M. Moorman, C. R. Goding, V. M. Christoffels. TBX3 and its splice variant TBX3 + exon 2a are functionally similar. *Pigment Cell Melanoma Res* **2008**, *21*, 379–387.

- [156] C. T. Basson, T. Huang, R. C. Lin, D. R. Bachinsky, S. Weremowicz, A. Vaglio, R. Bruzzone, R. Quadrelli, M. Lerone, G. Romeo, M. Silengo, A. Pereira, J. Krieger, S. F. Mesquita, M. Kamisago, C. C. Morton, M. E. Pierpont, C. W. Müller, J. G. Seidman, C. E. Seidman. Different TBX5 interactions in heart and limb defined by Holt-Oram syndrome mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 2919–2924.
- [157] A. Sen, C. Gadowski, J. Balles, Y. Abassi, C. Dorner, G. O. Pflugfelder. Null mutations in *Drosophila* Optomotor-blind affect T-domain residues conserved in all Tbx proteins. *Mol Genet Genomics* **2010**, *283*, 147–156.
- [158] M. A. Schneider, K. D. Scheffer, T. Bund, F. Boukhallouk, C. Lambert, C. Cotarelo, G. O. Pflugfelder, L. Florin, G. A. Spoden. The transcription factors TBX2 and TBX3 interact with human papillomavirus 16 (HPV16) L2 and repress the long control region of HPVs. *J Virol* **2013**, *87*, 4461–4474.
- [159] A. Abrahams, S. Mowla, M. I. Parker, C. R. Goding, S. Prince. UV-mediated regulation of the anti-senescence factor Tbx2. *J Biol Chem* **2008**, *283*, 2223–2230.
- [160] T. Yano, Y. Yamazaki, M. Adachi, K. Okawa, P. Fort, M. Uji, S. Tsukita, S. Tsukita. Tara up-regulates E-cadherin transcription by binding to the Trio RhoGEF and inhibiting Rac signaling. *J Cell Biol* **2011**, *193*, 319–332.
- [161] P. Huber, T. Crum, L. M. Clary, T. Ronan, A. V. Packard, P. G. Okkema. Function of the *C. elegans* T-box factor TBX-2 depends on SUMOylation. *Cell Mol Life Sci* **2013**, *70*, 4157–4168.
- [162] G. Gill. SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev* **2004**, *18*, 2046–2059.
- [163] A. M. Andreou, E. Pauws, M. C. Jones, M. K. Singh, M. Bussen, K. Doudney, G. E. Moore, A. Kispert, J. J. Brosens, P. Stanier. TBX22 missense mutations found in patients with X-linked cleft palate affect DNA binding, sumoylation, and transcriptional repression. *Am J Hum Genet* **2007**, *81*, 700–712.
- [164] C.-A. Renard, C. Labalette, C. Armengol, D. Cougot, Y. Wei, S. Cairo, P. Pineau, C. Neuveut, A. de Reyniès, A. Dejean, C. Perret, M.-A. Buendia. Tbx3 is

- a downstream target of the Wnt/beta-catenin pathway and a critical mediator of beta-catenin survival functions in liver cancer. *Cancer Res* **2007**, *67*, 901–910.
- [165] C. Giacinti, A. Giordano. RB and cell cycle progression. *Oncogene* **2006**, *25*, 5220–5227.
- [166] H. F. Farin, M. Bussen, M. K. Schmidt, M. K. Singh, K. Schuster-Gossler, A. Kispert. Transcriptional repression by the T-box proteins Tbx18 and Tbx15 depends on Groucho corepressors. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 25748–25759.
- [167] A. Kawamura, S. Koshida, S. Takada. Activator-to-repressor conversion of T-box transcription factors by the Ripply family of Groucho/TLE-associated mediators. *Mol Cell Biol* **2008**, *28*, 3236–3244.
- [168] X. Li, X. Zhao, Y. Fang, X. Jiang, T. Duong, C. Fan, C. C. Huang, S. R. Kain. Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 34970–34975.
- [169] T. K. Kim, J. H. Eberwine. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* **2010**, *397*, 3173–3178.
- [170] Y. Gluzman. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **1981**, *23*, 175–182.
- [171] X. Zhou, M. Vink, B. Klaver, B. Berkhout, A. T. Das. Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. *Gene Ther* **2006**, *13*, 1382–1390.
- [172] P. J. Southern, P. Berg. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J Mol Appl Genet* **1982**, *1*, 327–341.
- [173] M. J. Cabañas, D. Vázquez, J. Modolell. Dual interference of hygromycin B with ribosomal translocation and with aminoacyl-tRNA recognition. *Eur J Biochem* **1978**, *87*, 21–27.

- [174] V. Fetz, S. K. Knauer, C. Bier, J. P. von Kries, R. H. Stauber. Translocation Biosensors - Cellular System Integrators to Dissect CRM1-Dependent Nuclear Export by Chemicogenomics. *Sensors (Basel)* **2009**, *9*, 5423–5445.
- [175] C. J. J. Boogerd, L. Y. E. Wong, M. van den Boogaard, M. L. Bakker, F. Tessadori, J. Bakkers, P. A. C. 't Hoen, A. F. Moorman, V. M. Christoffels, P. Barnett. Sox4 mediates Tbx3 transcriptional regulation of the gap junction protein Cx43. *Cell Mol Life Sci* **2011**, *68*, 3949–3961.
- [176] D. Zhao, Y. Wu, K. Chen. Tbx3 isoforms are involved in pluripotency maintaining through distinct regulation of Nanog transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* **2014**, *444*, 411–414.
- [177] C. Couture, A. Saveanu, A. Barlier, J. C. Carel, M. Fassnacht, C. E. Flück, M. Houang, M. Maes, F. Phan-Hug, A. Enjalbert, J. Drouin, T. Brue, S. Vallette. Phenotypic homogeneity and genotypic variability in a large series of congenital isolated ACTH-deficiency patients with TPIT gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab* **2012**, *97*, E486–E495.
- [178] E. P. Kirk, M. Sunde, M. W. Costa, S. A. Rankin, O. Wolstein, M. L. Castro, T. L. Butler, C. Hyun, G. Guo, R. Otway, J. P. Mackay, L. B. Waddell, A. D. Cole, C. Hayward, A. Keogh, P. Macdonald, L. Griffiths, D. Fatkin, G. F. Sholler, A. M. Zorn, M. P. Feneley, D. S. Winlaw, R. P. Harvey. Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* **2007**, *81*, 280–291.
- [179] M. He, L. Wen, C. E. Campbell, J. Y. Wu, Y. Rao. Transcription repression by Xenopus ET and its human ortholog TBX3, a gene involved in ulnar-mammary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 10212–10217.
- [180] V. Garg, I. S. Kathiriya, R. Barnes, M. K. Schluterman, I. N. King, C. A. Butler, C. R. Rothrock, R. S. Eapen, K. Hirayama-Yamada, K. Joo, R. Matsuoka, J. C. Cohen, D. Srivastava. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* **2003**, *424*, 443–447.

- [181] F. Demay, B. Bilican, M. Rodriguez, S. Carreira, M. Pontecorvi, Y. Ling, C. R. Goding. T-box factors: targeting to chromatin and interaction with the histone H3 N-terminal tail. *Pigment Cell Res* **2007**, *20*, 279–287.
- [182] K.-J. Boogerd, L. Y. E. Wong, V. M. Christoffels, M. Klarenbeek, J. M. Ruijter, A. F. M. Moorman, P. Barnett. Msx1 and Msx2 are functional interacting partners of T-box factors in the regulation of Connexin43. *Cardiovasc Res* **2008**, *78*, 485–493.
- [183] S. A. Miller, A. C. Huang, M. M. Miazgowiec, M. M. Brassil, A. S. Weinmann. Coordinated but physically separable interaction with H3K27-demethylase and H3K4-methyltransferase activities are required for T-box protein-mediated activation of developmental gene expression. *Genes Dev* **2008**, *22*, 2980–2993.
- [184] K. Hitachi, H. Danno, S. Tazumi, Y. Aihara, H. Uchiyama, K. Okabayashi, A. Kondow, M. Asashima. The Xenopus Bowline/Ripply family proteins negatively regulate the transcriptional activity of T-box transcription factors. *Int J Dev Biol* **2009**, *53*, 631–639.
- [185] R. Singh, T. Horsthuis, H. F. Farin, T. Grieskamp, J. Norden, M. Petry, V. Wakker, A. F. M. Moorman, V. M. Christoffels, A. Kispert. Tbx20 interacts with smads to confine tbx2 expression to the atrioventricular canal. *Circ Res* **2009**, *105*, 442–452.
- [186] P. DeBenedittis, C. Harmelink, Y. Chen, Q. Wang, K. Jiao. Characterization of the novel interaction between muskelin and TBX20, a critical cardiogenic transcription factor. *Biochem Biophys Res Commun* **2011**, *409*, 338–343.
- [187] B. Zhu, M. Zhang, S. D. Byrum, A. J. Tackett, J. K. Davie. TBX2 blocks myogenesis and promotes proliferation in rhabdomyosarcoma cells. *Int J Cancer* **2014**, *135*, 785–797.
- [188] T. Dheen, I. Sleptsova-Friedrich, Y. Xu, M. Clark, H. Lehrach, Z. Gong, V. Korzh. Zebrafish *tbx-c* functions during formation of midline structures. *Development* **1999**, *126*, 2703–2713.
- [189] K. M. Dobrzycka, K. Kang, S. Jiang, R. Meyer, P. H. Rao, A. V. Lee, S. Oesterreich. Disruption of scaffold attachment factor B1 leads to TBX2 up-regulation, lack of

- p19ARF induction, lack of senescence, and cell immortalization. *Cancer Res* **2006**, *66*, 7859–7863.
- [190] H. F. Du, L. P. Ou, X. Yang, X. D. Song, Y. R. Fan, B. Tan, C. L. Luo, X. H. Wu. A new PKC α/β /TBX3/E-cadherin pathway is involved in PLC ϵ -regulated invasion and migration in human bladder cancer cells. *Cell Signal* **2014**, *26*, 580–593.
- [191] D. E. Hansel, A. Rahman, M. House, R. Ashfaq, K. Berg, C. J. Yeo, A. Maitra. Met proto-oncogene and insulin-like growth factor binding protein 3 overexpression correlates with metastatic ability in well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms. *Clin Cancer Res* **2004**, *10*, 6152–6158.
- [192] J. O. Humtsoe, E. Koya, E. Pham, T. Aramoto, J. Zuo, T. Ishikawa, R. H. Kramer. Transcriptional profiling identifies upregulated genes following induction of epithelial-mesenchymal transition in squamous carcinoma cells. *Exp Cell Res* **2012**, *318*, 379–390.
- [193] M. Lomnytska, A. Dubrovskaya, U. Hellman, N. Volodko, S. Souchelnytskyi. Increased expression of cSHMT, Tbx3 and utrophin in plasma of ovarian and breast cancer patients. *Int J Cancer* **2006**, *118*, 412–421.
- [194] K. Hoek, D. L. Rimm, K. R. Williams, H. Zhao, S. Ariyan, A. Lin, H. M. Kluger, A. J. Berger, E. Cheng, E. S. Trombetta, T. Wu, M. Niinobe, K. Yoshikawa, G. E. Hannigan, R. Halaban. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* **2004**, *64*, 5270–5282.
- [195] S. Mowla, R. Pinnock, V. D. Leaner, C. R. Goding, S. Prince. PMA-induced up-regulation of TBX3 is mediated by AP-1 and contributes to breast cancer cell migration. *Biochem J* **2011**, *433*, 145–153.
- [196] H. Carlson, S. Ota, Y. Song, Y. Chen, P. J. Hurlin. Tbx3 impinges on the p53 pathway to suppress apoptosis, facilitate cell transformation and block myogenic differentiation. *Oncogene* **2002**, *21*, 3827–3835.
- [197] N. Platonova, M. Scotti, P. Babich, G. Bertoli, E. Mento, V. Meneghini, A. Egeo, I. Zucchi, G. R. Merlo. TBX3, the gene mutated in ulnar-mammary syndrome,

- promotes growth of mammary epithelial cells via repression of p19ARF, independently of p53. *Cell Tissue Res* **2007**, *328*, 301–316.
- [198] J. Liu, T. Esmailpour, X. Shang, G. Gulsen, A. Liu, T. Huang. TBX3 over-expression causes mammary gland hyperplasia and increases mammary stem-like cells in an inducible transgenic mouse model. *BMC Dev Biol* **2011**, *11*, 65.
- [199] C. M. Fillmore, P. B. Gupta, J. A. Rudnick, S. Caballero, P. J. Keller, E. S. Lander, C. Kuperwasser. Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 21737–21742.
- [200] X. Zhang, D. Luo, G. O. Pflugfelder, J. Shen. Dpp signaling inhibits proliferation in the *Drosophila* wing by Omb-dependent regional control of bantam. *Development* **2013**, *140*, 2917–2922.
- [201] J. Peres, S. Mowla, S. Prince. The T-box transcription factor, TBX3, is a key substrate of AKT3 in melanomagenesis. *Oncotarget* **2015**, *6*, 1821–1833.
- [202] S. Roy Chowdhuri, T. Crum, A. Woollard, S. Aslam, P. G. Okkema. The T-box factor TBX-2 and the SUMO conjugating enzyme UBC-9 are required for ABA-derived pharyngeal muscle in *C. elegans*. *Dev Biol* **2006**, *295*, 664–677.
- [203] M. D. Lewis, S. A. Miller, M. M. Miazgowiec, K. M. Beima, A. S. Weinmann. T-bet's ability to regulate individual target genes requires the conserved T-box domain to recruit histone methyltransferase activity and a separate family member-specific transactivation domain. *Mol Cell Biol* **2007**, *27*, 8510–8521.
- [204] R. R. Copley. The EH1 motif in metazoan transcription factors. *BMC Genomics* **2005**, *6*, 169.
- [205] M. Wolff, S. Kredel, J. Wiedenmann, G. U. Nienhaus, R. Heilker. Cell-based assays in practice: cell markers from autofluorescent proteins of the GFP-family. *Comb Chem High Throughput Screen* **2008**, *11*, 602–609.
- [206] G. Gill, M. Ptashne. Negative effect of the transcriptional activator GAL4. *Nature* **1988**, *334*, 721–724.

- [207] S. J. Triezenberg, K. L. LaMarco, S. L. McKnight. Evidence of DNA: protein interactions that mediate HSV-1 immediate early gene activation by VP16. *Genes Dev* **1988**, *2*, 730–742.
- [208] C. E. Hellweg, *Nachweis UV-induzierter Genaktivierung in Säugerzellen mit Hilfe eines stabil in das Genom integrierten GFP-Vektors*, Ph.D. thesis, Freie Universität Berlin, Germany, **2001**.
- [209] A. Colosimo, K. K. Goncz, A. R. Holmes, K. Kunzelmann, G. Novelli, R. W. Malone, M. J. Bennett, D. C. Gruenert. Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Biotechniques* **2000**, *29*, 314–8, 320–2, 324 passim.
- [210] R. M. Mortensen, R. E. Kingston. Selection of transfected mammalian cells. *Curr Protoc Mol Biol* **2009**, *Chapter 9*, Unit9.5.
- [211] C. Lattenmayer, M. Loeschel, W. Steinfeldner, E. Trummer, D. Mueller, K. Schriebl, K. Vorauer-Uhl, H. Katinger, R. Kunert. Identification of transgene integration loci of different highly expressing recombinant CHO cell lines by FISH. *Cytotechnology* **2006**, *51*, 171–182.
- [212] P. Frit, N. Barboule, Y. Yuan, D. Gomez, P. Calsou. Alternative end-joining pathway(s): bricolage at DNA breaks. *DNA Repair (Amst)* **2014**, *17*, 81–97.
- [213] C. A. Waters, N. T. Strande, D. W. Wyatt, J. M. Pryor, D. A. Ramsden. Nonhomologous end joining: a good solution for bad ends. *DNA Repair (Amst)* **2014**, *17*, 39–51.
- [214] F. M. Wurm, M. Jordan. Gene transfer and gene amplification in mammalian cells. *New Comprehensive Biochemistry* **2003**, *38*, 309–335.
- [215] D. Stockholm, R. Benchaouir, J. Picot, P. Rameau, T. M. A. Neildez, G. Landini, C. Laplace-Builhé, A. Paldi. The origin of phenotypic heterogeneity in a clonal cell population in vitro. *PLoS One* **2007**, *2*, e394.
- [216] E. P. Papapetrou, M. Sadelain. Generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells with an excisable single polycistronic vector. *Nat Protoc* **2011**, *6*, 1251–1273.

- [217] D. Bouard, D. Alazard-Dany, F.-L. Cosset. Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br J Pharmacol* **2009**, *157*, 153–165.

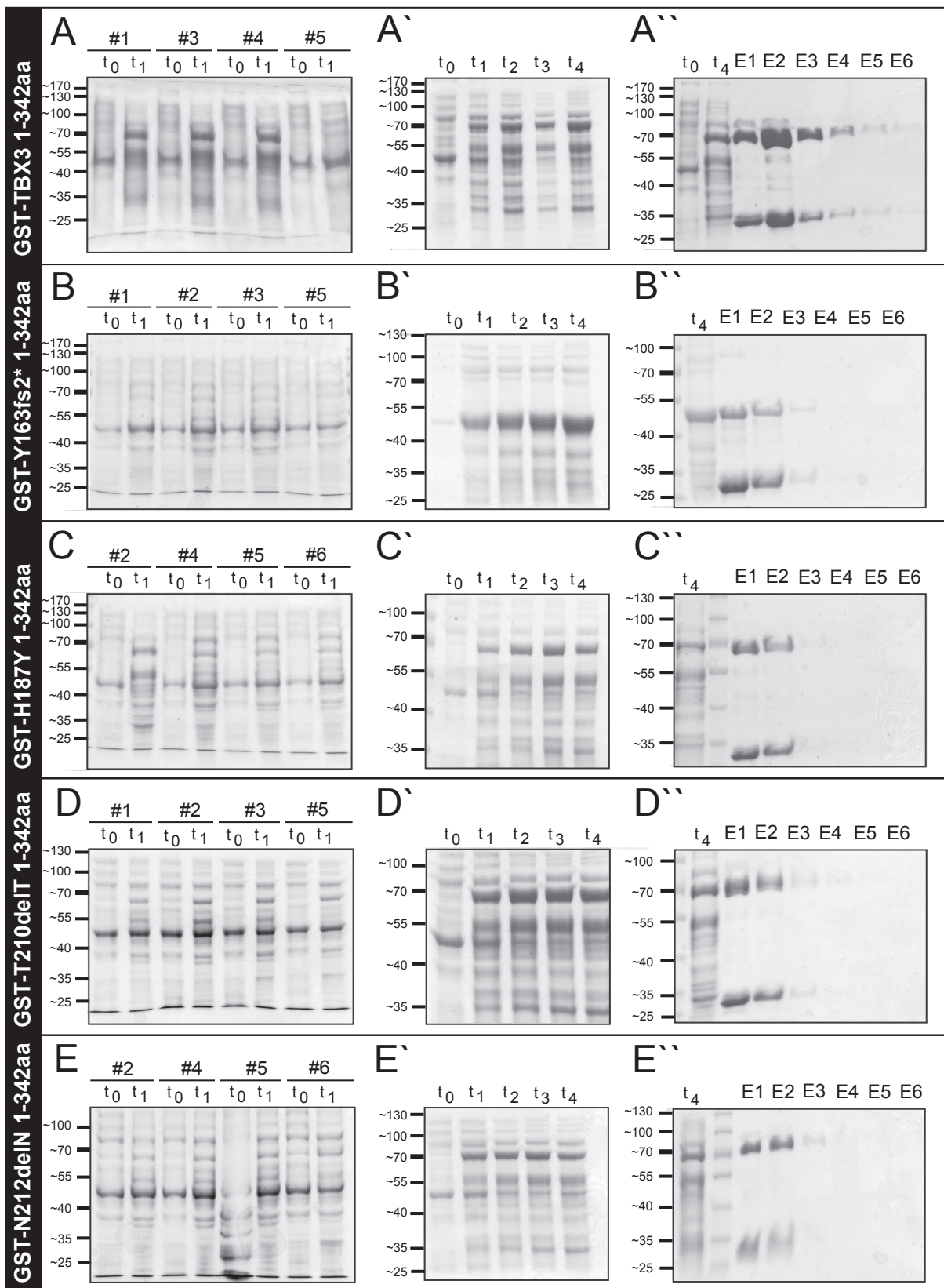
10 Anhang

10.1 Expression der rekombinanten

GST-TBX3 1-342aa-Fusionsproteine im

E. coli-Stamm BL21DE3

Abbildung 10.1: Expression der rekombinanten GST-TBX3 1-342aa Fusionsproteine im *E. coli* Stamm BL21DE3. Nach Transformation der TBX3 1-342aa/pGEX-2TK-Konstrukte in chem. kompetente *E. coli* (Stamm BL21DE3) wurden von jeder Transformation verschiedene Klone (#1-#6) bezüglich der Induzierbarkeit der GST-Fusionsproteine getestet (A-E). Die IPTG-Induktion erfolgte bei einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,4-0,8. Hierbei wurden t0-Aliquots zum Startpunkt der Induktion entnommen und lysiert und t1-Aliquots am Ende der Induktion (ca. 3-4 h). Das Gesamtprotein des Bakterienlysats wurde in einem 8 %-igen SDS-Gel separiert und Coomassie gefärbt. Vor der Aufreinigung der Proteine wurde ein zufällig gewählter Klon über einen Zeitraum von insgesamt vier Stunden induziert, wobei stündlich Aliquots (t0-t4) entnommen und lysiert wurden (A'-E'). Das Gesamtprotein des Bakterienlysats wurde in einem 8 %-igen SDS-Gel separiert und Coomassie gefärbt. Nach Verifizierung der bakteriellen Induzierbarkeit der GST-Fusionsproteine nach IPTG-Zugabe (A'-E') wurden diese mittels Affinitätschromatographie über GST-Säulen aufgereinigt. Die einzelnen Eluate (E1-E6) der aufgereinigten GST-TBX3 1-342aa Fusionsproteine wurden im 8 %-igen SDS-Gel separiert und Coomassie gefärbt.



10.2 Repression des p21-FLuc-Reporters durch die TBX3-Mutation Y163fs2*

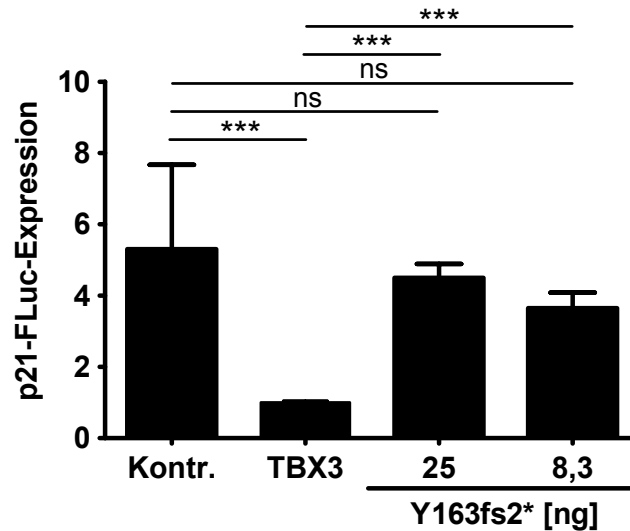


Abbildung 10.2: Repression des p21-FLuc-Reporters durch die Mutation von Y163fs2* in TBX3. COS-7-Zellen (10^5 /ml) wurden mit dem Reporterkonstrukt p21-FLuc ($0,25 \mu\text{g}/\text{ml}$) sowie den gezeigten Konzentrationen des Y163fs2* codierenden Konstrukts bzw. dem Leervektor pT-REx/GW-30/lacZ (Kontr.) oder dem TBX3 codierenden Konstrukt mittels FuGENEHD ($3 \mu\text{l}/\text{ml}$) cotransfiziert. Die TBX-Gesamtkonzentration von $0,25 \mu\text{g}/\text{ml}$ wurde entsprechend mit dem Leervektor pT-REx/GW-30/lacZ (Kontr.) aufgefüllt. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die RLU-Werte des Reporterassays wurden auf TBX3 normiert. Gezeigt ist der Mittelwert ($n=3$) plus SD. Signifikante Unterschiede wurden mit einem one-way ANOVA-Test mit Bonferoni-Posttest zur Kontr. und TBX3 berechnet. FLuc, Firefly Luciferase. ns, nicht signifikant.

10.3 In der ICGC-Datenbank gelistete

TBX-Mutationen

	EOM ES	T	TBR 1	TBX 1	TBX 2	TBX 3	TBX 4	TBX 5	TBX 6	TBX 10	TBX 15	TBX 18	TBX 19	TBX 20	TBX 21	TBX 22	total
Acute Myeloid Leukemia - KR	0	3	0	2	2	0	3	0	0	5	1	1	0	0	5	0	22
Benign Liver Tumour - FR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
Bladder Cancer - CN	1	1	0	0	0	1	3	2	0	2	0	0	1	0	0	1	11
Bladder Urothelial Cancer - TCGA, US	2	4	2	0	3	4	3	7	2	1	2	0	1	0	0	1	32
Brain Glioblastoma Multiforme - TCGA, US	1	2	1	1	0	0	4	1	0	1	2	0	1	1	1	3	18
Brain Lower Grade Glioma - TCGA, US	0	1	0	1	2	0	0	2	0	2	1	1	0	1	0	1	12
Breast Cancer - TCGA, US	3	4	4	2	3	27	4	8	1	5	4	7	4	4	2	10	92
Breast Triple Negative/Lobular Cancer - UK	0	1	0	9	1	4	6	7	1	1	9	10	5	9	1	1	65
Chronic Lymphocytic Leukemia - ES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Colon Adenocarcinoma - TCGA, US	8	10	8	6	6	8	12	13	11	7	11	14	5	9	4	5	137
Early Onset Prostate Cancer - DE	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	2	1	0	0	0	1	6
Esophageal Adenocarcinoma - UK	6	12	10	9	1	6	18	64	1	2	69	64	16	48	9	0	335
Esophageal Cancer - CN	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	4
Gastric Adenocarcinoma - TCGA, US	7	15	12	5	10	8	8	19	16	10	3	20	10	3	6	8	160
Gastric Cancer - CN	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3
Head and Neck Thyroid Carcinoma - TCGA, US	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0	1	0	0	5
Kidney Renal Clear Cell Carcinoma - TCGA, US	2	0	1	0	0	0	2	0	3	0	0	1	2	0	1	0	12
Kidney Renal Pap. Cell Carcinoma - TCGA, US	1	0	0	0	2	2	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	8
Liver Cancer - FR	1	2	2	2	3	1	8	9	6	3	22	67	8	2	6	4	146
Liver Cancer - NCC, JP	7	3	7	9	4	4	7	22	3	2	10	14	7	12	5	8	124
Liver Cancer - RIKEN, JP	8	12	11	0	6	11	17	52	2	5	73	73	24	67	11	24	396
Lung Cancer - KR	0	6	1	2	7	1	0	8	3	1	7	4	2	6	0	9	57
Lung Squamous Cell Carcinoma - TCGA, US	4	9	5	0	6	12	1	9	2	4	2	16	5	8	5	13	101
Malignant Lymphoma - DE	1	2	1	1	1	7	4	11	2	1	7	6	2	3	0	11	60
Oral Cancer - IN	2	0	1	0	0	0	1	1	0	8	57	0	0	1	0	0	71
Ovarian Cancer - AU	4	6	1	12	3	10	11	34	3	8	55	43	8	20	3	14	235
Ovarian Serous Cystadenoca. - TCGA, US	2	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	6
Pancreatic Cancer - AU	12	11	10	11	8	17	20	51	5	0	0	27	14	37	12	20	255
Pancreatic Cancer - CA	3	4	2	3	4	6	3	16	1	1	17	8	14	6	4	3	95
Pancreatic Cancer Endocrine neoplasms - AU	0	1	0	1	1	2	3	4	1	0	5	8	0	7	0	2	35
Pediatric Brain Cancer - DE	0	0	1	0	0	0	2	4	0	0	5	10	2	2	0	3	29
Prostate Adenocarcinoma - CA	1	0	0	0	0	0	3	0	0	4	0	0	1	0	0	0	9
Prostate Adenocarcinoma - TCGA, US	2	0	0	0	0	4	0	1	0	0	0	4	1	4	0	0	16
Prostate Adenocarcinoma - UK	1	1	0	0	0	2	1	0	0	0	0	2	0	0	0	1	8
Rectum Adenocarcinoma - TCGA, US	0	1	2	1	4	2	2	0	0	2	1	1	0	2	1	3	22
Renal Cell Cancer - EU/FR	1	2	3	5	9	2	15	16	1	2	19	27	5	10	5	2	124
Skin Cutaneous melanoma - TCGA, US	12	14	15	6	8	9	12	15	11	18	38	22	15	25	8	11	239
Thyroid Cancer - SA	1	2	4	4	8	2	3	5	5	4	3	2		1	3	3	50
total	93	131	105	93	102	153	171	390	83	96	428	457	150	294	94	163	3003

Tabelle 10.1: In der ICGC-Datenbank gelistete *TBX*-Mutationen. *TBX*-Mutationen aus 38 in der ICGC-Datenbank (Ausgabe 17) gelisteten Krebsgenomprojekten in alphabetischer Reihenfolge. Die *TBX3*-Mutationen sind in der entsprechenden Spalte grau hinterlegt. Ebenso sind die Mutationen des TCGA-Brustkrebs-Projekts grau hinterlegt, in welchem *TBX3* das häufigste mutierte *TBX*-Gen bei Brustkrebs ist.

10.4 Vergleich der somatischen Mutationsrate von *TBX3* mit der von anderen *TBX*-Genen

	EOM ES	T	TBR 1	TBX 1	TBX 2	TBX 3	TBX 4	TBX 5	TBX 6	TBX 10	TBX 15	TBX 18	TBX 19	TBX 20	TBX 21	TBX 22	Σ	ave rage	total
Liver Cancer - RIKEN, JP	2	3	2.8	0	1.5	2.8	4.3	13.1	0.5	1.3	18.4	18.4	6.1	16.9	2.8	6.1	100	6.25	396
Esophageal Adenocarcinoma - UK	1.8	3.6	3	2.7	0.3	1.8	5.4	19.1	0.3	0.6	20.6	19.1	4.8	14.3	2.7	0	100	6.25	335
Pancreatic Cancer - AU	4.7	4.3	3.9	4.3	3.1	6.7	7.8	20	2	0	0	10.6	5.5	14.5	4.7	7.8	100	6.25	255
Skin Cutaneous melanoma - TCGA, US	5	5.9	6.3	2.5	3.3	3.8	5	6.3	4.6	7.5	15.9	9.2	6.3	10.5	3.3	4.6	100	6.25	239
Ovarian Cancer - AU	1.7	2.6	0.4	5.1	1.3	4.3	4.7	14.5	1.3	3.4	23.4	18.3	3.4	8.5	1.3	6	100	6.25	235
Gastric Adenocarcinoma - TCGA, US	4.4	9.4	7.5	3.1	6.3	5	5	11.9	10	6.3	1.9	12.5	6.3	1.9	3.8	5	100	6.25	160
Liver Cancer - FR	0.7	1.4	1.4	1.4	2.1	0.7	5.5	6.2	4.1	2.1	15.1	45.9	5.5	1.4	4.1	2.7	100	6.25	146
Colon Adenocarcinoma - TCGA, US	5.8	7.3	5.8	4.4	4.4	5.8	8.8	9.5	8	5.1	8	10.2	3.6	6.6	2.9	3.6	100	6.25	137
Liver Cancer - NCC, JP	5.6	2.4	5.6	7.3	3.2	3.2	5.6	17.7	2.4	1.6	8.1	11.3	5.6	9.7	4	6.5	100	6.25	124
Renal Cell Cancer - EU/FR	0.8	1.6	2.4	4	7.3	1.6	12.1	12.9	0.8	1.6	15.3	21.8	4	8.1	4	1.6	100	6.25	124
Lung Squamous Cell Carcinoma - TCGA, US	4	8.9	5	0	5.9	11.9	1	8.9	2	4	2	15.8	5	7.9	5	12.9	100	6.25	101
Pancreatic Cancer - CA	3.2	4.2	2.1	3.2	4.2	6.3	3.2	16.8	1.1	1.1	17.9	8.4	14.7	6.3	4.2	3.2	100	6.25	95
Breast Cancer - TCGA, US	3.3	4.3	4.3	2.2	3.3	29.3	4.3	8.7	1.1	5.4	4.3	7.6	4.3	4.3	2.2	10.9	100	6.25	92
Oral Cancer - IN	2.8	0	1.4	0	0	0	1.4	1.4	0	11.3	80.3	0	0	1.4	0	0	100	6.25	71
Breast Triple Negative/Lobular Cancer - UK	0	1.5	0	13.8	1.5	6.2	9.2	10.8	1.5	1.5	13.8	15.4	7.7	13.8	1.5	1.5	100	6.25	65
Malignant Lymphoma - DE	1.7	3.3	1.7	1.7	1.7	11.7	6.7	18.3	3.3	1.7	11.7	10	3.3	5	0	18.3	100	6.25	60
Lung Cancer - KR	0	10.5	1.8	3.5	12.3	1.8	0	14	5.3	1.8	12.3	7	3.5	10.5	0	15.8	100	6.25	57
Thyroid Cancer - SA	2	4	8	8	16	4	6	10	10	8	6	4	0	2	6	6	100	6.25	50
Pancreatic Cancer Endocrine neoplasms - AU	0	2.9	0	2.9	2.9	5.7	8.6	11.4	2.9	0	14.3	22.9	0	20	0	5.7	100	6.25	35
Bladder Urothelial Cancer - TCGA, US	6.3	12.5	6.3	0	9.4	12.5	9.4	21.9	6.3	3.1	6.3	0	3.1	0	0	3.1	100	6.25	32
Pediatric Brain Cancer - DE	0	0	3.4	0	0	0	6.9	13.8	0	0	17.2	34.5	6.9	6.9	0	10.3	100	6.25	29
Acute Myeloid Leukemia - KR	0	13.6	0	9.1	9.1	0	13.6	0	0	22.7	4.5	4.5	0	0	22.7	0	100	6.25	22
Rectum Adenocarcinoma - TCGA, US	0	4.5	9.1	4.5	18.2	9.1	9.1	0	0	9.1	4.5	4.5	0	9.1	4.5	13.6	100	6.25	22
Brain Glioblastoma Multiforme - TCGA, US	5.6	11.1	5.6	5.6	0	0	0	22.2	5.6	0	5.6	11.1	0	5.6	5.6	16.7	100	6.25	18
Prostate Adenocarcinoma - TCGA, US	12.5	0	0	0	0	25	0	6.3	0	0	0	25	6.3	25	0	0	100	6.25	16
Brain Lower Grade Glioma - TCGA, US	0	8.3	0	8.3	16.7	0	0	16.7	0	16.7	8.3	8.3	0	8.3	0	8.3	100	6.25	12
Kidney Renal Clear Cell Carcinoma - TCGA, US	16.7	0	8.3	0	0	0	16.7	0	25	0	0	8.3	16.7	0	8.3	0	100	6.25	12
Bladder Cancer - CN	9.1	9.1	0	0	0	9.1	27.3	18.2	0	18.2	0	0	0	9.1	0	0	100	6.25	11
Prostate Adenocarcinoma - CA	11.1	0	0	0	0	0	0	33.3	0	0	44.4	0	0	11.1	0	0	100	6.25	9
Kidney Renal Pap. Cell Carcinoma - TCGA, US	12.5	0	0	0	25	25	12.5	0	12.5	12.5	0	0	0	0	0	0	100	6.25	8
Prostate Adenocarcinoma - UK	12.5	12.5	0	0	0	25	12.5	0	0	0	0	25	0	0	0	12.5	100	6.25	8
Early Onset Prostate Cancer - DE	0	16.7	0	0	0	0	16.7	0	0	0	33.3	16.7	0	0	0	16.7	100	6.25	6
Ovarian Serous Cystadenoca. - TCGA, US	33.3	0	16.7	16.7	0	0	0	16.7	16.7	0	0	0	0	0	0	0	100	6.25	6
Head and Neck Thyroid Carcinoma - TCGA, US	0	0	0	0	0	0	0	20	0	20	0	40	0	20	0	0	100	6.25	5
Esophageal Cancer - CN	0	0	0	0	0	25	0	25	0	0	0	0	0	50	0	0	100	6.25	4
Gastric Cancer - CN	0	33.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33.3	0	33.3	100	6.25	3
Benign Liver Tumour - FR	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	6.25	2
Chronic Lymphocytic Leukemia - ES	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	6.25	1

Tabelle 10.2: Vergleich der somatischen Mutationsrate von *TBX3* mit der von anderen *TBX*-Genen. Die *TBX*-Mutationen aus 38 in der ICGC-Datenbank (Ausgabe 17) gelisteten Krebsgenomprojekten sind entsprechend der abnehmenden Gesamtzahl an Mutationen geordnet. Die absolute Mutationsrate ist auf die Gesamtzahl der in einem Tumortyp identifizierten *TBX*-Mutationen normiert. Dies normiert den Effekt der unterschiedlichen Anzahl an analysierten Tumorproben sowie Tumor-intrinsische Unterschiede in der Mutationsrate. In der oberen, signifikanteren Tabellenhälfte ist *TBX3* (grau hinterlegt) das am häufigsten mutierte Gen bei Brustkrebs (TCGA-Datenset, grau hinterlegt), nicht aber bei anderen Tumortypen.

10.5 Positionen von Missense-Mutationen innerhalb des *TBX3*-Gens in unterschiedlichen Tumortypen

Project Code	Project Name	N-terminus 1-103	T-domain 104-288	C-terminus 289-723	mis-sense total	positions
BLCA-CN	Bladder Cancer - CN		1		1	223
BLCA-US	Bladder Urothelial Cancer - TCGA, US		3	1	4	109, 159, 275, 412
BRCA-US	Breast Cancer - TCGA, US		4	4	8	112, 113, 187, 187, 343, 545, 630, 700
COAD-US	Colon Adenocarcinoma - TCGA, US		2	2	4	254, 284, 605, 615
ESAD-UK	Esophageal Adenocarcinoma - UK	1		1	2	28, 653
ESCA-CN	Esophageal Cancer - CN			1	1	432
KIRP-US	Kidney Renal Papillary Cell Carcinoma - TCGA, US	1			1	8
LIRI-JP	Liver Cancer - RIKEN, JP		1		1	169
LUSC-KR	Lung Cancer - KR			1	1	409
LUSC-US	Lung Squamous Cell Carcinoma - TCGA, US		2	3	5	120, 260, 302, 444, 597
OV-AU	Ovarian Cancer - AU			1	1	459
PACA-AU	Pancreatic Cancer - AU		1	2	3	223, 463, 715
PACA-CA	Pancreatic Cancer - CA		1	1	2	200, 391
PRAD-US	Prostate Adenocarcinoma - TCGA, US			3	3	595, 653, 654
READ-US	Rectum Adenocarcinoma - TCGA, US		1		1	229
SKCM-US	Skin Cutaneous melanoma - TCGA, US	1	3	1	5	42, 122, 232, 233, 291
STAD-US	Gastric Adenocarcinoma - TCGA, US		1	2	3	115, 372, 392

Tabelle 10.3: Positionen von Missense-Mutationen innerhalb des *TBX3*-Gens in unterschiedlichen Tumortypen. Alphabetische Liste der somatischen Krebsgenom-Projekte der ICGC-Datenbank mit *TBX3*-Missense-Mutationen. Die Tabelle listet die Anzahl an Mutationen in drei verschiedenen Regionen des *TBX3*-Proteins sowie die Gesamtzahl an identifizierten *TBX3*-Missense-Mutationen. Die höchste *TBX3*-Mutationsrate wurde in Brustkrebs (TCGA, grau hinterlegt) identifiziert. Bei Brustkrebs sowie anderen Tumortypen, darunter Melanome, traten Missense-Mutationen gehäuft in der ca. 25 % des Gesamtproteins (723aa) umfassenden T-box-Domäne auf.

10.6 *TBX3* als signifikant mutiertes Gen in Brustkrebs

A) *TBX* ORF mutations in ICGC data set

	EOMES	T	TBR1	TBX1	TBX2	TBX3	TBX4	TBX5	TBX6	TBX10	TBX15	TBX18	TBX19	TBX20	TBX21	TBX22	Σ	Σ/16
frameshift	6	4	5	3	10	21	6	8	6	6	3	3	1	1	2	2	87	5,44
missense	37	38	34	12	29	45	28	61	39	32	50	60	23	42	22	46	598	37,38
syn	10	27	22	16	15	21	21	28	18	19	16	33	24	16	14	13	313	19,56
stop gained	3	3	4	0	2	4	3	1	1	2	2	3	1	3	1	1	34	2,13
in-frame del	1	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0,38
sum	57	72	65	31	56	96	58	98	64	59	71	99	49	62	39	62	1038	

B) *TBX* ORF mutations in ICGC data set (as percentage of sum of mutations in a given *TBX* gene)

	EOMES	T	TBR1	TBX1	TBX2	TBX3	TBX4	TBX5	TBX6	TBX10	TBX15	TBX18	TBX19	TBX20	TBX21	TBX22	Σ/16
frameshift	10,53	5,56	7,69	9,68	17,86	21,88	10,34	8,16	9,38	10,17	5,87	2,97	2,04	1,61	5,13	3,23	8,11
missense	64,91	52,78	52,31	38,71	51,79	46,88	48,28	62,24	60,94	54,24	97,80	59,41	46,94	67,74	56,41	74,19	56,29
syn	17,54	37,50	33,85	51,61	26,79	21,88	36,21	28,57	28,13	32,20	31,30	32,68	48,98	25,81	35,90	20,97	31,13
stop gained	5,26	4,17	6,15	0,00	3,57	4,17	5,17	1,02	1,56	3,39	3,92	2,97	2,04	4,84	2,56	1,61	3,19
in-frame del	1,75	0,00	0,00	0,00	0,00	5,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,43
sum	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

C) *TBX* ORF mutations in ICGC data set (as percentage of total mutations of a given mutation type)

	EOMES	T	TBR1	TBX1	TBX2	TBX3	TBX4	TBX5	TBX6	TBX10	TBX15	TBX18	TBX19	TBX20	TBX21	TBX22	Σ
frameshift	6,90	4,60	5,75	3,45	11,49	24,14	6,90	9,20	6,90	6,90	3,45	3,45	1,15	1,15	2,30	2,30	100,00
missense	6,19	6,35	5,69	2,01	4,85	7,53	4,68	10,20	6,52	5,35	8,36	10,03	3,85	7,02	3,68	7,69	100,00
syn	3,19	8,63	7,03	5,11	4,79	6,71	6,71	8,95	5,75	6,07	5,11	10,54	7,67	5,11	4,47	4,15	100,00
stop gained	8,82	8,82	11,76	0,00	5,88	11,76	8,82	2,94	2,94	5,88	5,88	8,82	2,94	8,82	2,94	2,94	100,00
in-frame del	16,67	0,00	0,00	0,00	0,00	83,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
percentage of total <i>TBX</i> ORF mutations	5,49	6,94	6,26	2,99	5,39	9,25	5,59	9,44	6,17	5,68	6,84	9,54	4,72	5,97	3,76	5,97	100,00

Tabelle 10.4: Den offenen Leserahmen (ORF) von *TBX*-Genen betreffende Mutationen des ICGC-Datensets. Die ORF-Mutationen von 16 *TBX*-Genen aller Tumortypen des ICGC-Datensets (Ausgabe 17) sind entsprechend fünf verschiedenen Mutationstypen gelistet. Die *TBX3*-Daten sind grau hinterlegt. (A) Gezeigt sind die absoluten Zahlen. *TBX3* enthält neben *TBX18* und *TBX5* die höchste Anzahl an ORF-Mutationen. (B) Normierung der Mutationsrate des jeweiligen *TBX*-Gens. Dies normiert die Daten auf die unterschiedlichen Gengrößen (siehe Tab. 6.3). In *TBX3* treten gehäuft Frameshifts und In-Frame Deletionen auf. (C) Die Normierung der Mutationsgesamtzahl eines Mutationstyps auf die einzelnen *TBX*-Gene zeigt die starke Anhäufung von In-Frame-Deletionen in *TBX3*.

10.7 DNA-Alignment

10.7.1 *TBX2dm* vs. *TBX2*

Query: Primer 1377 (*TBX2*-GR121-122A_{smut}-for)

Sbjct: *TBX2*-ORF

```

Query  1      GGTCATCACCAAGTCCGCTAGCCGGATGTTCCCCCCTTC  40
          ||| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct  345    GGTCATCACCAAGTCCGGGAGCGGGATGTTCCCCCCTTC  384
  
```

10.7.2 TBX3dm vs. TBX3

Query: Primer 1379 (TBX3-GR129-130ASmut-for)

Sbjct: TBX3-ORF (NM_005996.3)

```
Query 1      GTCATTACCAAGTCGGCTAGCCGAATGTTTCCTCCATTAAAG 43
            | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 370    GTCATTACCAAGTCGGGAAGCGAATGTTTCCTCCATTAAAG 412
```

10.7.3 Y163fs2* vs. TBX3

Query: Primer 1562 (TBX3-Y163fs2*-for)

Sbjct: TBX3-ORF (NM_005996.3)

```
Query 1      GCTGCTGATGACTGTCGTTTATAAATTTACAATTCTCGG 40
            | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 469    GCTGCTGATGACTGTCGTTTATAAATTTACAATTCTCGG 507
```

10.7.4 H187Y vs. TBX3

Query: Primer 1784 (TBX3-H187Y-for)

Sbjct: TBX3-ORF (NM_005996.3)

```
Query 1      CCAAAGAGGATGTACATTTACCCGGACAGCCCGCTACTG 40
            | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 541    CCAAAGAGGATGTACATTTACCCGGACAGCCCGCTACTG 580
```

10.7.5 T210delT vs. TBX3

Query: Primer 1564 (TBX3-T210del-for)

Sbjct: TBX3-ORF (NM_005996.3)

```
Query 1      CGTCACTTTCCACAAACTGAAACT---CAACAACATTTTCAGACAAACATGG
            | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 603    CGTCACTTTCCACAAACTGAAACTCACCAACAACATTTTCAGACAAACATGG
```

10.7.6 N212delN vs. TBX3

Query: Primer 1560 (TBX3-N212del-for)

Sbjct: TBX3-ORF (NM_005996.3)

```
Query 1      CCACAAACTGAAACTCAC---CAACATTTTCAGACAAACATGG 39
            | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 612    CCACAAACTGAAACTCACCAAACATTTTCAGACAAACATGG 653
```

10.7.7 Y149S vs. TBX3

Query: Primer 1566 (TBX3-Y149S-for)

Sbjct: TBX3-ORF (NM_005996.3)

```

Query 1   GGGCTGGATAAAAAAGCCAAATCATT TTTATTGATGGACATTATAGCTGC 50
          |||
Sbjct 424 GGGCTGGATAAAAAAGCCAAATCATT TTTATTGATGGACATTATAGCTGC 473

```

10.7.8 D275K vs. TBX3

Query: Primer 1568 (TBX3-D275K-for)

Sbjct: TBX3-ORF (NM_005996.3)

```

Query 1   GATAAGATAACCCAGTTAAAAATAAGACAACCC TTTTGCAAAGG 47
          |||
Sbjct 799 GATAAGATAACCCAGTTAAAAATAAGACAACCC TTTTGCAAAGG 845

```

10.7.9 LALA vs. TBX3

Query: Primer 1572 (TBX3-LALA-for)

Sbjct: TBX3-ORF (NM_005996.3)

```

Query 1   CAGCTCACCCGTCAGTCCGCGAGGGCGTTTGATGAAAGACACAAAAGG 49
          |||
Sbjct 886 CAGCTCACCCGTCAGTCCATGAGGGTGT TTTGATGAAAGACACAAAAGG 934

```

10.7.10 S674A vs. TBX3

Query: Primer 1786 (TBX3-S674A-for)

Sbjct: TBX3-ORF (NM_005996.3)

```

Query 1   GGACTCGGGCTCTGAACTCAACGCCCGCTCCTCCACGCTCTCC 43
          |||
Sbjct 1998 GGACTCGGGCTCTGAACTCAACAGCCGCTCCTCCACGCTCTCC 2040

```

10.7.11 GroBS vs. TBX3

Query: Primer 1668 (TBX3-GroBSmut-for)

Sbjct: TBX3-ORF (NM_005996.3)

```

Query 1   CGGGCGCCGGACTACGCCATGAGCGGGCGACCGGTCACCAGCCG 45
          |||
Sbjct 70   CGGGCGCCGGACTTCGCCATGAGCGGGTGTCTGGGTCACCAGCCG 114

```

10.7.12 CtBP1 vs. TBX3

Query: Primer 1524 (TBX3-CtBP1mut-for2)

Sbjct: TBX3-ORF (NM_005996.3)

```
Query 1      GCGGCGCTCTCGCTGAATGGCGCCAATGCCAAGCCGATCATG 42
            | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 154    GCGGCGCTCTCGCTGCCGGGCGCCCTGGCCAAGCCGATCATG 195
```

10.7.13 CtBP2 vs. TBX3

Query: Primer 1518 (TBX3-CtBP2mut-for)

Sbjct: TBX3-ORF (NM_005996.3)

```
Query 1      CCAACAGTTCTTCAACGGGCACGGCCTCTTCGCCCACCCAGCCAGTTTGC 51
            | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 1467   CCAACAGTTCTTCAACGGGCAAGCCCTCTTCCTGCACCCAGCCAGTTTGC 1517
```

10.7.14 CtBP3 vs. TBX3

Query: Primer 1520 (TBX3-CtBP3mut-for)

Sbjct: TBX3-ORF (NM_005996.3)

```
Query 1      CGTCCGCGGCCACCCTGGGCTTCCACGCCAGCAGCACGTCCTGG 45
            | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 1658   CGTCCGCGGCCACCCTGCCCTTCCACCTCCAGCAGCACGTCCTGG 1702
```

10.8 Die p21-Promotorsequenz

Sequenzierung von p21-GLuc mit pGLuc5595-for (Oligo 1338): Beginn des p21-Promotors ab C158 (grau markiert)

```
1 CGCCCTTCTC TTCTTTTTCA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG
61 GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCGCGC ACATTTCCCC
121 GAAAAGTGCC ACCTGACGTC GACGGATCGG GAGATCTGCT TGGGCAGCAG GCTGTGGCTC
181 TGATTGGCTT TCTGGCCATT AGGAACATGT CCCAACATGT TGAGCTCTGG CATAGAAGAG
241 GCTGGTGGCT ATTTTGTCTT TGGGCTGCCT GTTATCAGGT GAGGAAGGGG ATGGTAGGAG
301 ACAGAAGACC TCTAAAGGCC CCAGGTAAGC CTTAGCCTGT TACTCTGAAC AGGGTATGTG
361 ATCTGCCAGC AGATCCTTGC GACAGGGCTG GGATCTGATG CATGTGTGCT TGTGTGAGTG
421 TGTGCTGGGA GTCAGATTCT GTGTGTGACT TTTAACAGCC TGCTCCCTTG CCTTCCTCAG
481 GGCAGAAGTC CTCCCTTAGA GTGTGTCTGG GTACACATTC AAGTGCATGG TTGCAAACCT
541 TTTTTTTTAA AGCACTGAAT AGTACTAGAC ACTTAGTAGG TACTTAAGAA ATATTGAATG
601 TCGTGGTGGT GGTGAGCTAG AAGTTATAAA AAAAATTCTT TCCCAAAAAC AACAAACAAA
```

661 AGAATTATTT CATTGTGAAG CTCAGTACCA CAAAAATTTA AATAATTCAT TACAAGCCTT
 721 CATTAAAAAA AAATTTCTCC CCGAAGTAAA CAGACAGACA ATGTCTAGTC TATTTGAAAT
 781 GCCTGAAAGC AGAGGGGCTT CAAGGCAGTG GGAGAAGGTG CCTGTCCTCT GCTGGACATT
 841 TGACAACCAG CCCTTTGGAT GGCTTGTATG TATAGGAGCG AAGGTGCAGA CAGCAGTGGG
 901 GCTTAGAGTG GGGTCCTGAG GCTGTGCTGT GGCCCTTCTG GGGTTTAGCC

Sequenzierung von p21-GLuc mit pGLuc924-rev (Oligo 1337): Beginn des p21-Promotors
 ab C30 (grau markiert)

1 CATCTGCTGA TCGAGCTCGG TACCAGCTTC TGA

61 GCGCAGCTCT GCGCGGCCCT GATATACAAC CGCCCCGCC GGGCCCGCCT CAAGGAGCGC

121 GGACCCGCGC TCGGCCACCC GCGCCGCCCG GGACCGCCCT CCCC

181 GCTGCCCAGC GCGGAGCCAG CTGAGCCTGG CCGAGTTCCA GCAGGCCAGC CGGTCCC

241 ACCTCGCGTG CTGCAGAGGG GCACTTCCCT CCTCCCCAG TCCCTCGCCT GCGTTGGTGC

301 GCTGGACACA TTTCCCACG AAGTGAGCCA CAAATCTGGC TTTTTTACT TGGAGAATGA

361 GTTGGCACTC TCCAGGAGGA CACAGCACTG TTAGAATGAG CCCCTTTCT GGCTCACCGC

421 TGACCCACTC TGGCAGGCAA GGATTTACCC AATGCAGCTG AAAAGATCAG GAGGATGACA

481 TTAATACATA AAAATTCATA AATTATAAAA ACGATGCACC TCTCTGCAAT TTCCAGAAAA

541 GCCCCACAAT ATCACCTCTA TTCCCACTGA TCCCTACTA GGTCACCTCT CCCAGAAGCA

601 CCTGGAGCAC CTAGACACCC CAACAAAGCA TCTTGAGGCC GGAATGATTT TTCAGTCCCG

661 TTTATTTTAC AGATGAGGAA ATTGAGGTCC ACTGAACTTA AGTATACAAA GTTGTGATT

721 GTCACATGCT TCCGGGAAGG AGGGAATTGG AGAGACTACC AAAAAAGGGC AACCTGATCT

781 CCAGGGAAC AGAAGAATTG GACATTGAAC CAATCTCCCT ACACCCTACA CTCACCTGAA

841 CAGAAGAACC CCTGTGGTTG CAGCAGCTTT GTTGGCCAGG AAAGGGGAGG ATTTGACGAG

901 TGAGTTGTCT GTCTCCTGAA TACTCCCAC ATAGCCCGTA TACTGCTG GGGAAACTGG

961 GGCTCAGAGA AGTCTGGTGA CCTAACTCAG ATCATGCAGC AAAGAAATGA CTATAGTTGG

1021 GAACACAGGA CTTTTGCCTC CTGCCC

1081 TCCAAATGAC AAAATGCCAA TACCCTCATT GCAGATGTTA TGAGATGACG TAATAAGACA

1141 TCTGGAGTGT CTA

1201 CAATCTTA