

Analyse der genomischen Struktur des humanen *GRAF* Gens
(GTPase Regulator Associated with FAK) bei Patienten mit
Akuter Myeloischer Leukämie (AML)

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Cathrin Maria Link
aus Heidelberg

Gießen 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde
Abteilung für pädiatrische Onkologie und Hämatologie
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Leiter: Prof. Dr. A. Reiter

Gutachter: Prof. Dr. A. Borkhardt
Gutachter: Prof. Dr. Dr. F. Grimminger

Tag der Disputation: 06.05.2008

Für Maria

Abkürzungen.....	3
1 EINLEITUNG.....	6
1.1 Tumorentstehung durch genetische Veränderungen.....	6
1.1.1 Protoonkogene.....	7
1.1.2 Tumorsuppressorgene.....	8
1.2 Myelodysplastisches Syndrom und Akute Myeloische Leukämie.....	9
1.3 Das 5q Syndrom.....	11
1.4 Akute Leukämie und MLL.....	12
1.5 Das GRAF-Gen.....	13
2 PROBLEMSTELLUNG DER ARBEIT.....	14
3 MATERIAL UND METHODEN.....	15
3.1 Patienten.....	15
3.2 Zelllinien.....	15
3.3 Isolierung genomischer DNA.....	16
3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA.....	16
3.5 Isolierung von Plasmid DNA aus E.coli.....	16
3.6 Isolierung von RNA.....	17
3.7 cDNA Synthese.....	18
3.8 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	18
3.8.1 Nested PCR.....	19
3.8.2 Hot Start PCR.....	20
3.8.3 Long Range PCR.....	20
3.9 Agarosegel- Elektrophorese.....	22
3.10 DNA Verdau mit Restriktions Enzymen.....	23
3.11 Topo TA Klonierung.....	24
3.12 DNA Sequenzierung.....	25
3.13 Yeast Two-Hybrid System.....	26
3.13.1 Hefekulturen.....	28
3.13.2 Herstellung der Köderkonstrukte.....	29
3.13.3 Herstellung der Beutekonstrukte.....	30
3.13.4 Entwicklung von Fusionsproteinen.....	30
3.13.5 Transformation in Hefezellen.....	32
3.13.6 Plasmid DNA Isolation aus Hefezellen.....	33
3.13.7 Herstellung von Hefeextrakten für Western-Blots.....	34
3.13.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
3.14 Westernblot.....	35
4 ERGEBNISSE.....	38
4.1 Bestimmung der genomischen Struktur des GRAF Gens.....	38
4.2 Sequenz der Exon-Intron Übergänge.....	41
4.3 Analyse der GRAF Sequenz in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie.....	43
4.4 Sequenzierung der genomischen DNA eines Klonen, der Intronsequenz in der cDNA enthält.....	47

4.5 Analyse der Protein-Protein Interaktionen.....	49
4.5.1 Klon 4 und sein Genprodukt.....	49
4.5.2 Klon 8 und sein Genprodukt.....	50
4.5.3 Klon 11 und sein Genprodukt.....	50
4.5.4 Genprodukt der GRAF Mutanten	51
5 DISKUSSION.....	54
5.1 Struktur des GRAF Gens.....	54
5.2 Insertion von GRAF Intronsequenz in cDNA	55
5.3 Funktion des GRAF Proteins.....	57
5.4 Tumorentstehung durch Veränderung im GRAF Gen und seinem Genprodukt	59
5.5 Protein Interaktionen.....	60
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	62
6 Conclusion	64
7 ANHANG.....	66
A1 GRAF cDNA in 5' -> 3' Richtung.....	66
A2 Aminosäuresequenz des GRAF Gens.....	67
A3 Amplifizierung der Exons des GRAF Gens.....	68
A4 Die Exon-Intron-Grenzen des GRAF Gens.....	69
mA5 Klone, in denen das GRAF Gen enthalten ist.	76
A6 Primersequenzen.....	77
A7 Aminosäuresequenzen des Patientenmaterials.....	80
A8 Vektoren	81
A9 Medien.....	85
A10 Puffer	87
A11 Abbildungsverzeichnis	88
A12 Tabellenverzeichnis.....	89
8 REFERENZEN.....	90

Abkürzungen

AD	Aktivierungs Domäne
AML	Akute Myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
AS	Antisense, 3'→ 5'
ATP	Adenosintriphospat
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäres DNA-Molekül, das als Kopie einer RNA durch reverse Transkription entsteht
CIP	Calf Intestine Phosphatase
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CTP	Cytosintriphospat
D	Dalton, Größeneinheit von Proteinen
ddNTP	Dideseoxynucleotidtriphosphate
del(5q)	Verlust des langen Armes des Chromosoms 5
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleid Acid
DNA-BD	DNA- Bindungs Domäne
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat , steht für dATP,dTTP,dGTP und dCTP
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid Tetrasodium Salt Hydrat
Enhancer	DNA Kontrollsequenz, die die Transkriptionsgeschwindigkeit eines Gens beeinflusst
FAB	„ French-American-British “,eine Französisch-Amerikanisch-Britische Arbeitsgruppe, die sich mit der Klassifizierung von Leukämien anhand morphologisch-zytochemischer Kriterien befasst
FAK	Focal Adhesion Kinase , Tyrosinkinase, die an der Signalübermittlung in der Zelle beteiligt ist
GAL	Galaktose
GAP	GTPase aktivierendes Protein , das an ein Ras- oder Ras verwandtes GTP bindendes Protein bindet und GTP zu GDP hydrolysiert

GEF	G uanine nukleotide e xchange f actor
Genomische DNA	DNA, die das Genom einer Zelle darstellt, enthält Exons und Introns
GNRP	G uanosin N ukleotid r eleasing (freisetzendes) P rotein, bindet an ein Ras- oder Ras artiges Bindeprotein und aktiviert es, indem es die Dissoziation von GDP und die Bindung von GTP veranlasst
GRAF	G TPase r egulator a ssociated with F AK
GTP	G uanosin t ri p hosfat
HIS	H istidin
kD	Kilo Dalton
kb	K ilobasen = 1000 Basenpaare
LB-Medium	L uria- B ertani Medium
LEU	L euicin
LiAc	L ithium A zetat
MAP	M itogen a ktiviert e P roteinkinase
MCS	M ultiple C loning S ite
MDS	M yelod y splastisches S yndrom
MEN	M ultiple e ndokrine N eoplasie
MLL	M ixed L ineage L eukemia
OD	Optische Dichte
ORF	O pen R eading F rame
PCR	Polymerase Kettenreaktion (P olymerase C hain R eaction)
PEG	P oly e thyleng l ycol
Pfu	Thermostabile DNA Polymerase von P yro c occus f uriosus
PH Domäne	P leckstrin H omology, Protein Domäne
Primer	Oligonukleotid, das als Startermolekül bei der DNA Synthese dient
Promotor	Sequenzelement in DNA, an das die RNA Polymerase II bindet, um die Transkription eines DNA Abschnittes zu starten
Plasmid	kleines ringförmiges DNA Molekül, das in Bakterien unabhängig vom Genom vermehrt wird, dient häufig als Vektor in Klonierungen
RAF	RAF Oncogen
RAS Protein	R at S arcoma, GTPase

Rho Protein	Ras homology , GTPase
RNA	Ribonukleid Acid
rpm	rounds per minute
S	Sense, 5' → 3'
SD Medium	synthetical drop out Medium
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfat), ein Detergens
SH3	src homolgy 3
snRNP	small nuclear ribonucleoprotien particles, Spleissenzyme
Spleissen	Verarbeitungsprozess der prä-mRNA zur mRNA, bei der die Intronsequenzen herausgeschnitten werden und die Exons miteinander verbunden werden
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethyl-ethylendiamin : Starter bei der Polymerisation des Acrylamidgels
TRP	Tryptophan
TTP	Thymidintriphosphat
Tween20	Polyoxyethylenesorbitanmonolaurate
URA	Uracil
UTR	Untranslatierte Region
WT	Wildtyp
YPD	Yeast extract peptone dextrose , Kulturmedium für Hefen
X-GAL	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactosid, Substrat der β- Galaktosidase

1 Einleitung

1.1 Tumorentstehung durch genetische Veränderungen

Genetische Anomalien wirken sich in einer veränderten Struktur und Funktion von Genprodukten aus, durch die sich Zellwachstum und Differenzierung den vielfältigen Kontrollmechanismen entziehen können.¹ Mutationen können auf zwei Wegen zu unkontrollierter Zellteilung und Tumorbildung führen.

Zum einen können sie durch eine Überaktivierung eines stimulierenden Gens (gain of function) hervorgerufen werden. Solche überaktiven Gene werden Onkogene genannt, während man das entsprechende noch unveränderte Gen als Protoonkogen bezeichnet. Mutationen, die ein Onkogen betreffen, bezeichnet man dann als dominant, wenn bereits ein verändertes Allell zur Tumorentstehung ausreicht. Zu den Mechanismen, die zur Aktivierung von Protoonkogenen führen, zählen die Amplifikation, aktivierende Mutationen und die Fusion durch Translokation.^{2,3}

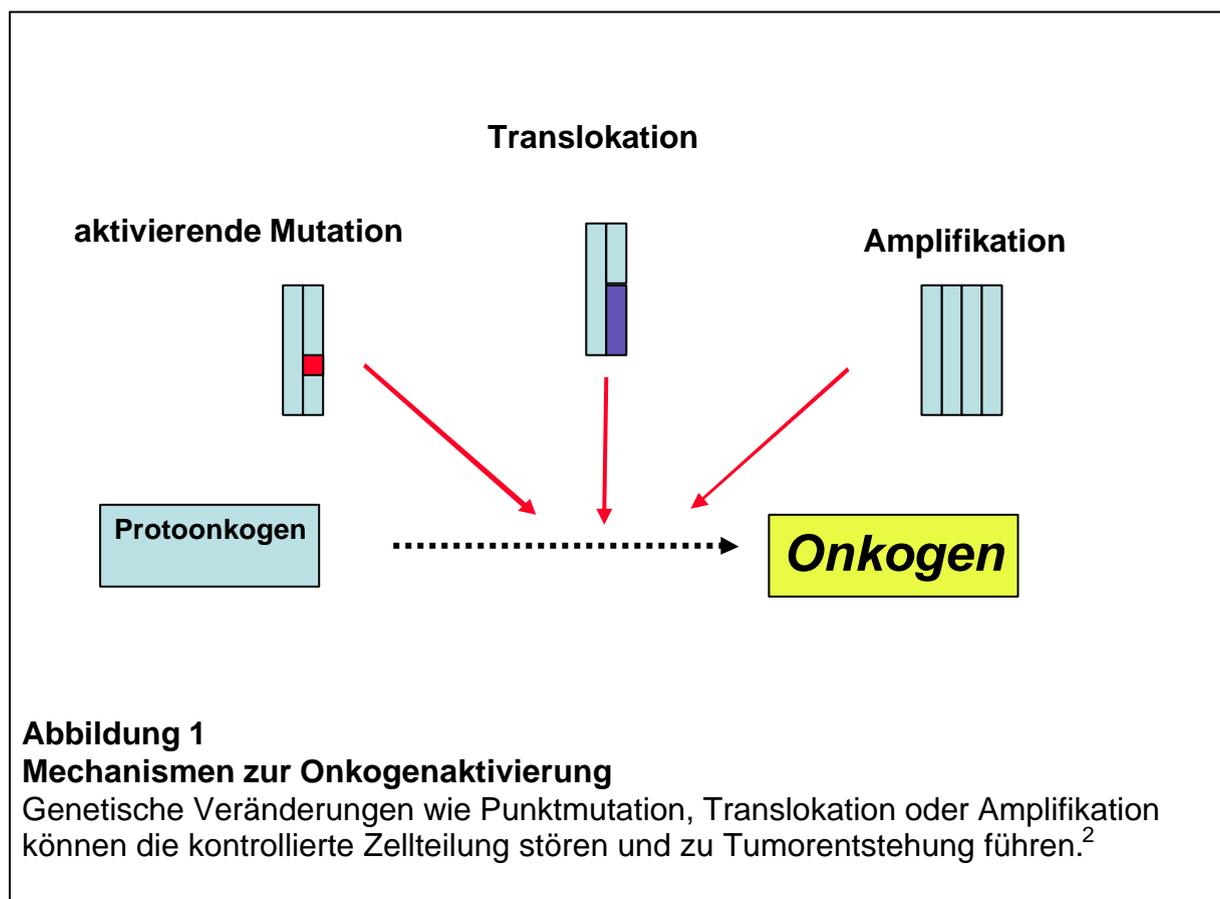


Abbildung 1

Mechanismen zur Onkogenaktivierung

Genetische Veränderungen wie Punktmutation, Translokation oder Amplifikation können die kontrollierte Zellteilung stören und zu Tumorentstehung führen.²

Der zweite bekannte Weg zur Tumorentstehung ist die Inaktivierung eines hemmenden Gens (loss of function), eines sogenannten Tumorsuppressorgens.³ Zur Aufhebung der hemmenden Wirkung der Tumorsuppressorgene kommt es erst, wenn beide Allele verändert sind, man nennt diese Mutationen deshalb rezessiv.

1.1.1 Protoonkogene

Protoonkogene fungieren als Wachstumsfaktoren, Zelloberflächenrezeptoren, intrazelluläre Signalübermittler, Transkriptionsfaktoren, Cyclin abhängige Kinasen und Kinaseinhibitoren. Zu den Mechanismen der Onkogenese zählen Deletionen oder Punktmutationen in der kodierenden Sequenz, die Amplifikation des Gens, Translokationen und die Rekombination zwischen einem Protoonkogen und der RNA eines Retrovirus. Diese Mechanismen können zu einer Veränderung der kodierenden Sequenz führen, so dass ein überaktives Genprodukt entsteht. Veränderungen in regulativen Sequenzen, die die Aktivität des Gens steuern, können bewirken, dass das betroffene Gen übermäßig oft abgelesen und translatiert wird, und somit ein normales Protein in viel größerer Menge gebildet wird und vorliegt. Die selbe Folge hat eine Translokation, die das Gen in die Nähe eines starken Enhancers bringt. Seit den 70er Jahren sind etwa 250 Onkogene beschrieben worden.^{4,5}

Tabelle 1
Bekannte Onkogene und Tumore, in denen sie aktiviert sind⁴

Onkogen	Funktion	Tumor
abl	Tyrosin-Proteinkinase	CML
myc	Nukleäres Protein	Burkitt Lymphom, Bronchial-, Zervix-, Mammakarzinom
L-myc	Nukleäres Protein, Mediator für Wachstumsfaktor	Bronchialkarzinom
N-myc	Down Regulation Activin A ⁶	Neuroblastom, kleinzelliges Bronchialkarzinom
erbB-1/ EGFR B	epidermaler Wachstumsfaktor	Glioblastome, Plattenepithelkarzinome
erbB-2/her- 2/neu	Tyrosinrezeptor Kinase ⁷	Mamma-, Ovarial-, Bronchialkarzinom
sis	Tyrosinkinase ⁸	Glioblastom
src	Membran gebundene Proteinkinase	Kolonkarzinom
H-ras	Membran gebundenes G-Protein mit GTPase Aktivität	Bronchial-, Kolon-, Pankreaskarzinom

Onkogen	Funktion	Tumor
K-ras	GTPase ⁹	Melanom, Schilddrüsenkarzinom, AML, ALL
N-ras	GTPase ⁹	Melanom, Schilddrüsen-, Harnblasenkarzinom
int-2	Fibroblastenwachstumsfaktor ⁴	Mammakarzinom
ret	Tyrosinkinase ¹⁰	Schilddrüsenkarzinom

Eines der bekanntesten Beispiele für ein Protoonkogen ist *abl*, dessen Umwandlung zum Onkogen zu der Entwicklung von Chronisch Myeloischer Leukämie führt. Das Gen *abl* liegt auf dem Chromosom 9 und wird durch eine Translokation auf Chromosom 22 mit dem *bcr*- Gen fusioniert. Durch diese Translokation entsteht das sogenannte „Philadelphia Chromosom“ mit *bcr/abl* an der Fusionsstelle. In ihm ist die Aktivität der Kinase Domäne von *abl* gesteigert und führt durch die Phosphorylierung bestimmter Proteine zu einer übermäßigen Bildung hämatopoetischer Knochenmarkzellen und damit zur CML.¹¹

Ein weiteres Beispiel für eine Tumorentstehung durch Translokation ist das Burkitt Lymphom. Bei 75-85 % der Patienten kommt dabei durch eine Translokation *c-myc* auf Chromosom 8 in die Nähe eines Immunglobulin Locus, meist auf Chromosom 14. Der Enhancer des Immunglobulin Locus kann dadurch die Transkription von *c-myc* steuern und seine Expression steigern.¹² Dies führt über die größere Menge des Genprodukts zur Entstehung des Burkitt Lymphoms.

1.1.2 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene werden über ihre negative Regulierung der Protoonkogene definiert. Im Unterschied zu Onkogenen bezeichnet man Suppressorgene als rezessive Tumorgene, weil erst eine Schädigung auf beiden Allelen zum völligen Funktionsausfall und damit zur Tumorentstehung führt.³

Tabelle 2
Bekannt Tumorsuppressorgene⁴ und Tumore, in denen sie aktiviert sind

Gen	Funktion des Produkts	mit Funktionsverlust assoziierte Tumore
Rb	TF	Retinoblastom, Osteosarkom, Karzinome von Mamma, Harnblase u. Lunge
p53	TF	multiple, Li Fraumeni Syndrom
APC	Signaltransduktion	Kolon-, Prostatakarzinom, familiäre Adenomatose

Gen	Funktion des Produkts	mit Funktionsverlust assoziierte Tumore
MCC	Zytoplasma	Kolon-, Prostatakarzinom, familiäre Adenomatose
DCC	Zelladhäsion	Kolon-, Ösophaguskarzinom
WT-1	TF	Wilms Tumor, Denys-Drash Syndrom
VHL	Transkriptionsregulation, Elongation	Von-Hippel-Lindau Syndrom, Nierenzellkarzinom
NF-1	GTPase-Aktivator ¹³	Von Recklinghausen Neurofibromatose Typ 1
NF-2	assoziiert mit Zytoskelett	Neurofibromatose Typ 2
BRCA-1	DNS-Reparaturenzym ¹⁴	hereditäre (sporadische) Mamma- u. Ovarialkarzinome
BRCA-2	DNS-Reparaturenzym	hereditäre (sporadische) Mammakarzinome
hMSH2	DNS-Reparaturenzym	Kolonkarzinom
hPMS1	DNS-Reparaturenzym	Kolonkarzinom
hMLH1	DNS-Reparaturenzym	Kolonkarzinom

Das bekannteste Tumorsuppressorgen ist *p53*. *p53* wird als "Wächter der gesamten Genomstabilität" bezeichnet, denn bei ca. 60% aller menschlichen Tumoren ist ein Funktionsverlust von *p53* nachzuweisen. Dabei betreffen die Mutationen immer wieder die selben Codons. Nach der Schädigung des ersten *p53* Allells kann es zur Inaktivierung des zweiten Allells durch Deletion des Locus 17p oder durch eine pathologische Interaktion des mutierten mit dem noch unveränderten Allell kommen. Neben diesen beiden Pathomechanismen ist noch ein weiterer bekannt, der klinisch sehr bedeutsam ist. Virale Onkoproteine können *p53* binden und es inaktivieren, so dass die betroffenen Zellen proliferieren und resistent gegen Apoptose werden. Ein bekanntes virales Onkoprotein ist E6 des Humanen Papillomavirus, das vor allem bei jüngeren Frauen das Cervixcarcinom verursacht.³

1.2 Myelodysplastisches Syndrom und Akute Myeloische Leukämie

Das Myelodysplastischen Syndrom (MDS) wird auch Präleukämie genannt.^{15,16}

Dabei handelt es sich um eine heterogene Gruppe potentiell maligner Erkrankungen der blutbildenden Zellen. Es kommt zur klonalen Expansion einer hämatopoetischen Vorläuferzelle. Die neoplastischen Zellen reifen unterschiedlich weit aus. Neben einer beschleunigten intramedullären Apoptose und einem Funktionsdefekt der klonalen Zellen kommt es durch Verdrängung ausreifungsfähiger Vorläuferzellen zum klinischen Bild einer peripheren Zytopenie.¹⁷ Mehr als 50% der MDS Fälle

transformieren zu einer akuten myeloischen Leukämie. Die Inzidenz des MDS liegt bei 50 Jährigen bei 3,5 /100 000 Einwohner, bei über 70 Jährigen bei 30-49/100000. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung liegt bei 65 Jahren, männliche Patienten überwiegen.¹⁷ Diagnosekriterien für das Vorliegen eines myelodysplastischen Syndroms sind eine variable, eher gesteigerte Zelldichte, Zeichen der Dysmyelopoese in mindestens zwei Zellreihen und ein Anteil an Blasten im Blut oder Knochenmarkausstrich über 5%, was für die Diagnosestellung einer AML jedoch zu niedrig ist. Von den charakteristischen zytogenetischen Veränderungen bei MDS betreffen 13 bis 20% -5 oder 5q-.¹⁷ Die Kinder sind bei Diagnosestellung im Vergleich zu anderen hämatologischen Erkrankungen etwas älter. Durch die periphere Zytopenie sind die Kinder anämisch, blass, müde, infektionsanfällig und neigen zu Blutungen. Nach unterschiedlich langem Verlauf kann die Erkrankung in eine akute Leukämie münden.

Bei der akuten myeloische Leukämie (AML) handelt es sich um die zweit häufigste Leukämie im Kindesalter mit einer Inzidenz von 0,7 bezogen auf 100 000 Kinder unter 15 Jahren. Jungen und Mädchen erkranken fast gleich häufig bei einem Inzidenzverhältnis von 1,1 :1.¹⁸ Die AML lässt sich nach zytomorphologischen, immunologischen, zytogenetischen und molekulargenetischen Merkmalen in prognostische Risikogruppen einteilen, die für die Therapieform entscheidend sind. Kriterien zur Einteilung in Risikogruppen sind die Unterform der AML, die Leukämiezellmasse bei Diagnosestellung, sowie morphologische und zytogentische Befunde.¹⁵ Ein hohes Rezidivrisiko besteht bei initialem ZNS Befall und später kompletter Remission.

Die Einteilung in die verschiedenen Subtypen der AML und des MDS erfolgt nach der FAB (French-American-British) Klassifikation und richtet sich nach zytomorphologischen und immunologischen Merkmalen.

Tabelle 3
FAB Klassifikation der AML ¹⁹

FAB	Subtyp	Morphologie	Zytogenetik	Häufigkeit
M 0	AML ohne Ausreifung	Myeloblasten ohne Granula		< 5%
M 1	AML mit minimaler Ausreifung	Myeloblasten +/- Granula	t(9;22)	15 - 20%
M 2	AML mit Ausreifung	Myeloblasten mit Granula, einzelne Myelozyten	t(8;21)	25 - 30%
M 3	Akute Promyelozytenleukämie	Promyelozyten, deutlich granuliert	t(15;17)	5 - 10%
M 4	Akute myelomonozytäre Leukämie	Myeloblasten und Promyelozyten > 20%	Inv/del(16)	20 - 30 %
M 5a	Akute Monoblastenleukämie ohne Ausreifung	Große Monoblasten	t/del(11)	5%
M 5b	Akute Monoblastenleukämie mit Ausreifung	Monoblasten, Promonozyten und Monozyten; Monozytose im peripheren Blut	t(8;16)	5 - 10%
FAB	Akute Erythroleukämie	Megaloblastäre Erythropoese > 50%, Myeloblasten > 30%		5%
M 0	Akute Megakaryoblastenleukämie	Megakaryoblasten		5%

1.3 Das 5q Syndrom

Die zweite strukturelle Chromosomenveränderung, die nach dem Philadelphia Chromosom entdeckt wurde, ist die sogenannte Deletion 5q.²⁰ Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion zwischen dem Verlust der gesamten Region telomerisch von 5q12 bis zum Verlust von lediglich 5q31 variiert. Aus diesem Ergebnis wurde die These aufgestellt, dass durch die chromosomale Deletion nicht zwei Protoonkogene verbunden werden, sondern dass es sich bei 5q31 um ein Tumorsuppressorgen handelt. Gemäß der "Two Mutation Hypothese" von Knudson²¹ käme es dabei zuerst zu einer Deletion des ersten Allels, eine weitere Deletion oder Methylierung des Promotors würde dann zum Verlust des zweiten Allels führen, also zum Verlust des Tumorsuppressorgens und damit zur Tumorentstehung.

Das klinische Erscheinungsbild des 5q Syndroms beinhaltet Anämie, Dysmegkaryopoese, hypobulierte Megakaryozyten, Macrozytose, normale bis erhöhte Thrombozytenzahl und den Verlust der Region 5q, vor allem del(5q31q33). Frauen sind etwas häufiger betroffen als Männer. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung ist in der siebten Lebensdekade. Das Risiko zur leukämischen Transformation wird gering eingestuft und liegt bei 20 %. Hämatologische Neoplasien im Zusammenhang mit Deletion 5q sind bei der Entstehung von akuter myeloischer Leukämie und dem

Myelodysplastische Syndrom besonders häufig.²⁰ Beim MDS treten sie mit einer Häufigkeit von 13 bis 20% auf.¹⁷

1.4 Akute Leukämie und MLL

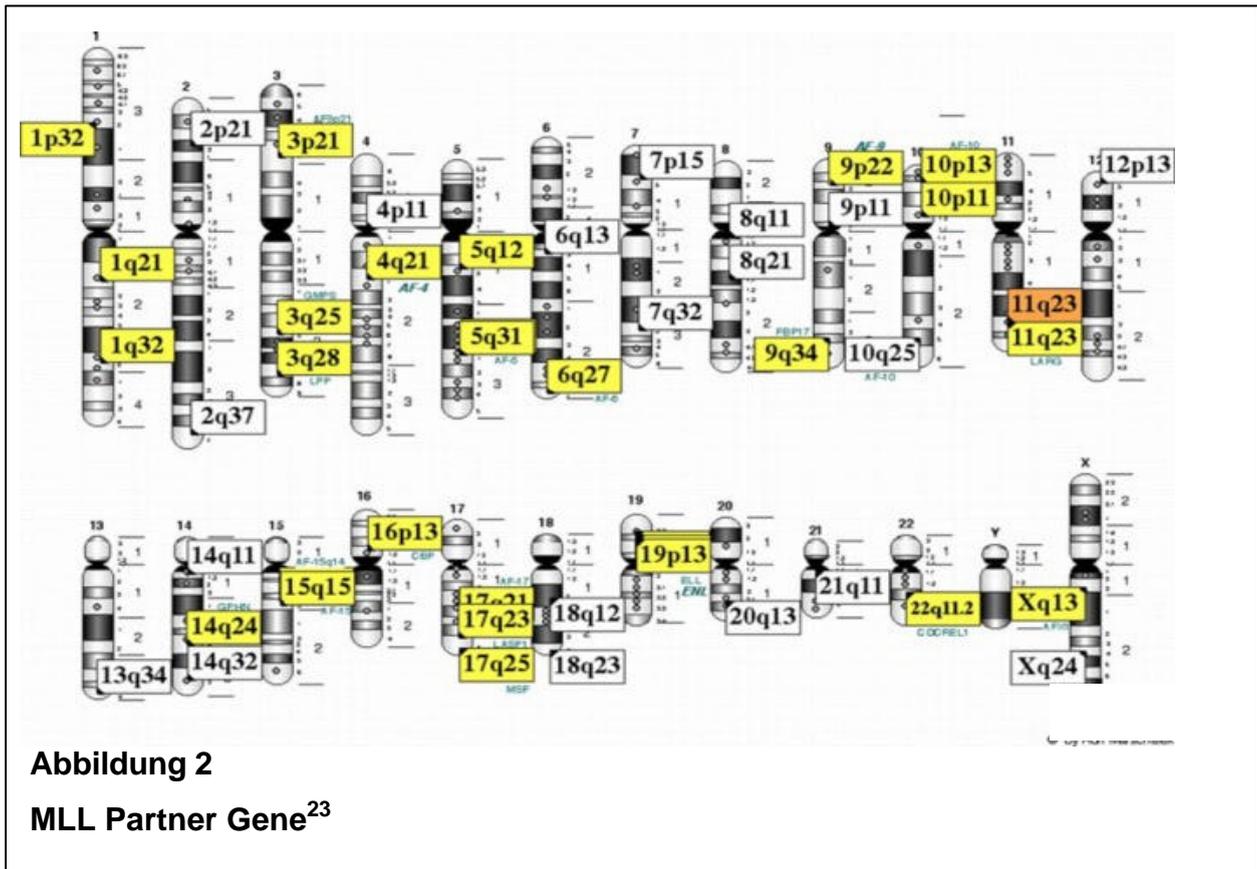
Unter dem Begriff Leukämie versteht man eine klonale Erkrankung des blutbildenden Systems.²² Die entarteten Zellen vermehren sich unkontrolliert und verdrängen die normale Blutbildung. Jährlich erkranken ca. 50 pro 1 Million Einwohner. Bei Kindern sind Leukämien die häufigste maligne Erkrankung mit 45%. Man unterscheidet nach dem klinischen Verlauf akute und chronische Leukämien, je nach entarteter Zellart lymphatische und myeloische und unterteilt diese noch nach dem Reifegrad der veränderten Zellreihe.²²

Bei Krebserkrankungen des blutbildenden Systems, also den Leukämien und Lymphomen, kommt ein Typ der genetischen Veränderung besonders häufig vor. Das sind die reziproken chromosomalen Translokationen, bei denen Chromosomenarme zwischen verschiedenen Chromosomen ausgetauscht werden.

Eine Translokation ist besonders häufig bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) und bei der akuten myeloischen Leukämie (AML). Sie betrifft das *MLL* Gen (mixed lineage leukemia), das selbst auf 11q 23 für eine Histon H3K4

Methyltransferase kodiert.²³ Durch die Translokation wird die Transkription des *MLL* Gens verändert, so dass ein verändertes Genprodukt entsteht.

Insgesamt sind 87 verschiedene Translokations Partner Gene, die das *MLL* Gen betreffen, bekannt, 51 davon sind charakterisiert. Chromosomale Rearrangements des *MLL* Gens sind ein Marker für aggressive Arten akuter Leukämien.²⁴ Die *MLL* Partner Gene sind in Abbildung 2 graphisch dargestellt.



1.5 Das *GRAF*-Gen

Dr. Stig Egil Bojesen gelang es, das oben beschriebene Gen auf 5q31 zu isolieren.²⁵ Dabei handelt es sich um das *MLL* Partner Gen *GRAF*. Es stimmt in den Aminosäuren 170 bis 759 zu 92 % mit dem von Hildebrand, Taylor und Parson beschriebenen *Graf*Gen beim Huhn²⁶ überein und ist das humane Äquivalent des Hühner *Graf* Gens. *GRAF* steht für „GTPase activating protein for Rho associated with FAK“. Es wird auch als KIAA0621 oder OPHN1L bezeichnet.

Bei dem *GRAF* Gen handelt es sich wahrscheinlich um ein Tumorsuppressor Gen. Es kommt in zwei Isoformen vor, der leukozytären Form aus 2282 bp und der im Gehirn auftretende Isoform von 2442 bp. Die leukozytäre Isoform A besteht aus 759 AS und hat eine Größe von 86 kDa, die Isoform B enthält 814 AS entsprechend 92 kDa. Eine starke Expressierung des *GRAF* Proteins findet sich in epithelalem Gewebe, vor allem in den Betazellen der Pankreas Inseln, in Hoden, Prostata, Brustdrüse, gastrointestinalen Drüsen und dem Plattenepithel der Haut. Ebenfalls stark exprimiert wird es in Nervengewebe, unter anderem auch in den Ganglienzellen des Darms.²⁷ In Kardiomyozyten, erythropoetischen Zellen und Lebergewebe wird es zwar exprimiert, allerdings weniger stark. Analysen der subzellulären Lokalisation des *GRAF* Proteins konnten zeigen, dass *GRAF* sich diffus im Zytoplasma der Zelle verteilt und es nur zu einem sehr geringen Anteil nukleär lokalisiert ist.²⁷

2 Problemstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die genomische Struktur des *GRAF* Gens exakt zu untersuchen, sowie Zahl und Größe der Exons zu bestimmen.

Es soll versucht werden, Mutationen im *GRAF* Gen bei Patienten mit AML oder MDS zu identifizieren und auf einen Funktionsverlust der *GRAF*- Mutanten auf Proteinebene zu prüfen.

Daneben wurde die Sequenz der partiellen genomische DNA eines Patienten analysiert, um die Ursache für die Insertion von Intronsequenzen zu untersuchen, die in mehreren cDNA Proben der Patienten nachgewiesen werden konnte.

3 Material und Methoden

Eine Liste und Zusammensetzung aller verwendeten Puffer und Medien befindet sich im Anhang unter A9 und A10.

3.1 Patienten

Es wurden Blut – und Knochenmarkproben von Patienten verwendet, die an einer AML erkrankt waren und sowohl zytogenetisch den Verlust eines Allels im Bereich 5q31 als auch eine Blastenzahl von mehr als 80% aufwiesen.

Tabelle 4

Liste der in dieser Arbeiten untersuchten Patienten.

Die Klone wurden nach ihrer Länge durchnummeriert, wobei Klon1 der längste war. Die Karyotypen werden entsprechend den Vorgaben der ISCN²⁸ beschrieben.

Patient	Geburtsjahr	Diagnose	Karyotyp	Klon Nr.
H,D	1990	sek AML	45,XY,-7	1
B,J	1998	AML	46 XX,?add(7)(q36),?del(12)(p13)	2
G,J	1997	AML bei M. Down	48,XX,del(5)(p14),+8,+21c	3,6,11
S,E	1993	AML M5	46,XX	4
T,K	1983	AML M2	47,XX,+8	5,10
S,C	1984	AML M1	46,XX	7,13
J,F	1983	AML	47,XY,+4	8
F,J	1987	AML	46,XY,9qh-	9
G,J	1989	AML	45,XY,-7	12
N,A	1996	AML	48~51,XX,der(1)(q31),der(3)(p24),der(4),+6,-8,-11,-11,der(12)(p?12),-13,+15,+21,+21,+2~4mar[cp8]	14

3.2 Zelllinien

Zur Amplifizierung der Exon-Intron-Übergänge wurde DNA der Zelllinien HL-60, MV4 11 und K562 verwendet. Dabei handelt es sich um humane Leukämie-Zelllinien ohne 5q31Aberrationen, d.h. sie enthalten den GRAF Wildtyp.

Tabelle 5

Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Leukämie	Genrekombination	Depositor
HL 60 ^{29,30}	AML (FAB M2)		Dr.E. Pofiri, London, UK
MV 4-11 ³¹	AML (FAB M5)	MLL-AF4	H. Drexler, Braunschweig
K-562 ³²	CML	M-BCR/ ABL	H. Drexler, Braunschweig

3.3 Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA³³ aus ca. 5×10^6 Zellen wurde das Genomic Mini Prep Protokoll des CamgenTM Mammalian Genomic DNA Purification Kit (Whatman, Cambridge, UK) verwendet. Zur Vorbereitung der Blutprobe gibt man das dreifache Probenvolumen der Blood Cell Lysis Solution zur Patientenprobe, vortext und lässt es für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Nach einminütigem Zentrifugieren bei 1500 x g wird der Überstand verworfen, das Pellet mit einfachem Probenvolumen gewaschen und der Überstand erneut verworfen. Das Pellet wird in 300 µl GEN I Puffer durch vortexen resuspendiert, 300 µl GEN II Puffer und 150 µl GEN III Puffer werden zugegeben, danach zentrifugiert man bei 20000 x g für 5 Minuten. Der Überstand wird ohne Verunreinigung durch das Pellet in ein sauberes Cup überführt, und nach Zugabe von 450 µl Isopropanol 100% wird erneut für 10 Minuten bei 20000 x g zentrifugiert. Das Präzipitat wird mit 200 µl 70%igen Ethanol gewaschen und erneut für 3 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes trocknet man das Pellet und löst es dann in 50 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,6 oder sterilem Wasser. Das Auflösen kann durch Inkubation bei 37°C und gelegentlichem vorsichtigem Durchmischen beschleunigt werden. Der DNA Gehalt wird am Spektralphotometer bestimmt.

3.4 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA Konzentration³⁴ einer Lösung wurde mit Hilfe des Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm nach folgender Formel bestimmt:

$$c = OD_{260} \times n \times f$$

c	Konzentration in µg/ml
OD_{260}	optische Dichte bei ? 260 nm
n	Eichfaktor, für DNA Faktor 50
f	Verdünnungsfaktor

3.5 Isolierung von Plasmid DNA aus E.coli

Die Plasmid DNA wurde mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab, Erlangen) isoliert.³⁴ Dazu bewegt man die Bakterienkultur in 5 ml mit Ampicilin versetztem LB-Medium bei 37°C und 250 Schüttelbewegungen pro Minute über 12-16 h.

Nach Abzentrifugieren der Bakteriensuspension bei 10 000 x g für 1 min wird der Überstand verworfen. Danach resuspendiert man das Pellet in 250 µl Lösung I +

RNase A und lysiert es durch Zugabe von 250 µl Lösung II. Nach Zugabe von 350 µl Lösung III wird die Bakterien DNA gefällt und an große Salzpartikel gebunden. Die hohe Salzkonzentration bewirkt eine Fällung denaturierter Proteine, chromosomaler DNA sowie von Zelltrümmern, während die kleinere Plasmid-DNA in Lösung bleibt. Nach zehnmütigem Zentrifugieren bei 10000 x g kann man den Überstand in HiBind-Miniprep-Zentrifugensäulen überführen. Sie enthalten ein Anionen Austausch Harz, das positiv geladene Gruppen enthält, die die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA in Abhängigkeit von der Osmolarität und des pHs der Lösung binden. Erneutes Zentrifugieren (1 min, 10000 x g) lässt das Lysat die Silikonmembran passieren, wobei die Plasmid DNA im Zentrifugensäulchen bindet, der Säulendurchfluß wird verworfen. Mit 500 µl HB-Puffer wird die Zentrifugensäule durch erneutes Zentrifugieren (1 min, 10000 x g) gewaschen. Im zweiten Waschschrift wird die DNA mit 750 µl des mit absolutem Ethanol komplettierten DNA-Waschpuffers durch Zentrifugieren (10000 x g/ 1 min) gereinigt. Einmütiges Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit entfernt den noch verbliebenen Puffer. Um die DNA aus der HiBind-Miniprep-Zentrifugensäule zu lösen, werden 50 µl H₂O in die Mitte der Säulen pipettiert und durch zweimütiges Zentrifugieren bei 10000 x g kann die DNA in einem sauberen Cup aufgefangen werden.

3.6 Isolierung von RNA

Die Isolation der Gesamt RNA erfolgte unter Verwendung des TRIzol™ Reagenz (Gibco, Karlsruhe) nach der von Chomczynski und Sacchi beschriebenen Methode für die Guanidin Isothiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion.^{34, 35}

In Flüssigmedium gewachsene Zellen werden durch Zentrifugieren (1500 x g, 10 min) pelletiert und pro 5-10 x 10⁶ Zellen in 1 ml Trizol durch Auf- und Abpipettieren gelöst. Während einer Inkubation von 5 Minuten bei Raumtemperatur dissoziieren die Nucleoproteinkomplexe. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform pro eingesetztem 1 ml Trizol und Zentrifugieren (12000 x g, 15 min, 4°C) überführt man die wässrige Phase in ein frisches Cup und fällt die RNA durch Zugabe von 500 µl 100% Isopropanol und erneutem Zentrifugieren (max. 12000 x g, 10 min, 4°C). Das RNA-Pellet wird mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen, 10 Minuten im offen Cup getrocknet und in RNase freiem Wasser gelöst. Der RNA Gehalt wird am Spektralphotometer bestimmt, wobei eine Absorption von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm einem RNA Gehalt von 40 µg/ml entspricht.

3.7 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese erfolgte mit dem Superscript™ First Strand Synthese System für RT-PCR (Gibco, Karlsruhe).

Ein 20µl cDNA Synthese Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

10µl RNA (500 ng)

1µl Random Primer Hexamer (100 pmol/µl)

1µl dNTPs (10mM)

Diesen Ansatz lässt man für 5 Minuten bei 65°C inkubieren, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen und stellt ihn danach für 1 Minute auf Eis.

Dazu gibt man

4 µl 5 x First Strand Buffer

2 µl DTT (0,1M)

1 µl RNase OUT recombinant Ribonuklease Inhibitor (40 U/µl)

1 µl Superscript II (200 U/µl)

Die Synthese der cDNA erfolgte unter folgendem Temperaturprofil:

25°C 10min

42°C 50min

70°C 15min

Der letzte Schritt dient zur Inaktivierung des Enzyms.

3.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine in vitro Methode zur exponentiellen und spezifischen Amplifikation einer beliebigen DNA Sequenz.^{36, 37} Voraussetzung dafür ist, dass die beiden Enden des Segments bekannt sind. So können zwei spezifische Oligonukleotide, sogenannte Primer, entworfen werden, die komplementär zur DNA sind und mit ihr hybridisieren, um die Amplifikation initiieren zu können. Die PCR besteht aus drei Reaktionsschritten, die alle temperaturabhängig sind. Nach der initialen Denaturierung bei 93°C-95°C liegt die DNA in Form zweier Einzelstränge vor, an die in der Annealingphase die beiden Primer, „sense“ und „antisense“, gebunden werden. Dies geschieht bei 50°C- 70°C, abhängig von der Länge und dem G/C-Gehalt der Oligonukleotide. In der Extensionsphase synthetisiert die Polymerase

einen zum vorliegenden Einzelstrang komplementären Strang entsprechend der Sequenz des Templates. Hierfür werden hitzestabile Polymerasen wie die Taq Polymerase von *Thermus aquaticus* verwendet, die die zur Denaturierung benötigte hohe Temperatur unbeschadet überstehen, so dass ein mehrmaliges Durchlaufen aller drei Zyklen ohne Aktivitätsverlust des Enzyms möglich ist. Diese drei Reaktionsschritte werden 30 – 40 mal wiederholt, wobei es theoretisch bei jedem Zyklus zu einer Verdoppelung des DNA Gehaltes kommt. Am Ende der PCR ist das Verhältnis von Polymerase zu Target allerdings sehr niedrig, die synthetisierte DNA akkumuliert und bildet komplexe Interaktionen. Dadurch verläuft die DNA Vermehrung dann lediglich linear und stagniert schließlich, so dass das Amplifikat am Reaktionsende weniger als 2^n (n = Zahl der Zyklen) beträgt.

Ein typischer PCR Ansatz von 50 μ l besteht aus

5.0 μ l 10 x Reaction Buffer

1.5 μ l $MgCl_2$ (50mM)

5.0 μ l dNTPs (8mM total, je 2mM von dATP, dTTP, dGTP, dCTP)

1.0 μ l Sense Primer (20 μ M)

1.0 μ l Antisense Primer (20mM)

0.2 μ l Taq Polymerase (5U/ μ l)

1.0-5.0 μ l DNA (1-100 ng/ μ l)

H₂O ad 50 μ l

Temperaturprofil:

94°C für 1 min

30 x (94°C für 15 sec, 60°C für 30 sec, 72°C für 1 min)

72°C für 10 min

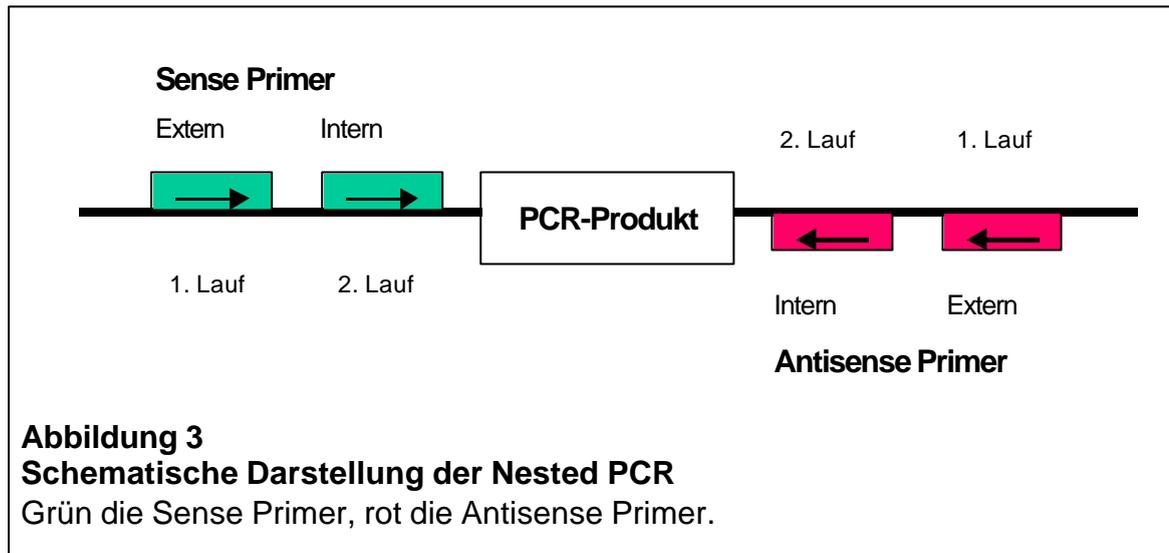
4°C Lagerungstemperatur

Die PCR Reaktionen wurden mit einem Thermocycler PE-9600 (Perkin-Elmer, Langen, Deutschland) durchgeführt.

3.8.1 Nested PCR

Sowohl Sensitivität als auch Spezifität der PCR werden durch die Nested PCR deutlich verbessert. Dabei schaltet man einen zweiten PCR Durchgang hinter den ersten. Als Template des zweiten Laufes setzt man 1- 0.001 μ l des PCR Produktes vom ersten Lauf ein, die Primer im zweiten Lauf liegen „innerhalb“ der vorher

benutzten, d.h. der zweite sense Primer liegt downstream, der zweite antisense Primer upstream der ersten.



3.8.2 Hot Start PCR

Eine hohe Spezifität der PCR ist essentiell wegen der exponentiellen Vermehrung der DNA. Sie kann verbessert werden indem die Polymerase erst nach Erreichen der Schmelztemperatur der Primer zugegeben wird, so dass ein unspezifisches Annealing der Primer verhindert wird. Dieser Effekt kann zum einen durch eine Trennung der Primer von der Polymerase durch eine Wachsschicht erzielt werden, die erst bei 80°C schmilzt. Diese Technik wurde in der vorliegenden Arbeit bei der Long Range PCR verwendet und in 3.8.3 beschrieben. Eine andere Methode für Hot Start PCR ist die Verwendung einer mit inhibierenden Antikörpern gekoppelten Taq Polymerase, die erst durch eine 10 minütige Inkubation bei 95°C aktiviert wird.

3.8.3 Long Range PCR

Mit der Taq-Polymerase sind Amplifikationen von mehr als 5 kb nicht möglich, da es bei längeren Fragmenten häufiger als in vivo zu falsch eingebauten Nukleotiden kommt. Davon können auch die Primerbindungsstellen betroffen sein, so dass die Oligonukleotide nicht mehr exakt binden können oder sich an neu entstandene falsche Bindungsstellen anlagern.

Größere Fragmente bis zu 35 kb können mit der Long Range PCR hergestellt werden, wie Cheng et al.³⁸ gezeigt haben. Der Unterschied zur herkömmlichen PCR mit Taq Polymerase liegt darin, dass bei dieser Methode neben einer thermostabilen Polymerase eine weitere Polymerase mit 5'-3'- Exonukleaseaktivität verwendet wird.

Dieses Enzym kontrolliert die DNA-Stränge und kann Fehler beim Einbau der Nukleotide korrigieren (proof reading function). Um die Spezifität zu erhöhen, werden bei der Long Range PCR sehr lange Oligonukleotide (> 30 Basen) mit hoher Schmelztemperatur verwendet. Die dadurch ermöglichte hohe Annealingtemperatur verhindert eine Amplifikation unspezifischer PCR Produkte. Wegen der hohen Annealingtemperatur ist ein separater Annealingschritt nicht notwendig, so dass anstelle des 3- Temperaturen Protokolls ein 2-Temperaturen Protokoll verwendet werden kann. Da die amplifizierten Fragmente wesentlich länger als in der herkömmlichen PCR sind, ist eine etwas längere Extensionszeit erforderlich. Um während des Temperaturanstiegs bis zum Beginn des ersten Zyklusses unspezifische Primerbindungen, Bildung von Primerdimeren und Veränderung am 3' Ende der Primer durch die Exonuklease zu verhindern, wird eine Hotstart PCR durchgeführt. Bei dem hier verwendeten Gene Amp^R XL PCR Kit (Perkin Elmer, Langen) werden die Primer von Template und Enzym durch eine Wachsschicht getrennt, die erst bei 80°C schmilzt und somit erst dann den Beginn der Reaktion ermöglicht.

Unterer Ansatz:

- 12 µl 3,3 x XL Puffer II
- 8 µl dNTP (je 2 µl 10mM dATP, dTTP, dCTP und dGTP)
- 4,8 µl MG(OAc)₂ (25mM)
- 1,6 µl Primer sense (20 µM)
- 1,6 µl Primer antisense (20 µM)
- 12 µl bidestilliertes Wasser

Auf den Mix wird eine Schicht aus AmpliWax^R PCR Gem 100-Wachskugeln gegeben. Der Ansatz wird für 5 min bei 80°C und 5 min bei 25°C inkubiert, so dass das Wachs zunächst schmilzt und dann nach dem Abkühlen ein Schicht auf dem unteren Ansatz bildet.

Oberer Ansatz:

50-200 ng Template DNA

2 μ l rTth-DNA-Polymerase XL (2 U/ μ l)

18 μ l 3,3 x XL Puffer II

ad 60 μ l H₂O

Temperaturprofil:

94°C - 1 min

12 x (94°C - 15 sec, 68°C- 10 min)

16 x (94°C - 15 sec, 68°C- 10 min + Δ (Δ = + 15 sec pro Zyklus)

72°C - 10 min

4°C Lagerungstemperatur

3.9 Agarosegel- Elektrophorese

DNA besitzt in wässriger Lösung ein negativ geladenes Zucker-Phosphat Gerüst. Durch diese negative Ladung wandern DNA Fragmente im elektrischen Feld in Richtung der Anode und lassen sich so über ein Gel der Länge nach auftrennen.³⁴ Zur Herstellung eines Gel kocht man Agarose mit 1 x TAE Puffer kurz auf und gießt es in eine abgedichtete Gelkammer, in die ein Kunststoffkamm eingesetzt wurde, der Vertiefungen ausspart, in die später die Proben pipettiert werden. Nach Abkühlen und Erhärten des Gels plaziert man den Gelträger in der Elektrophoresekammer, überschichtet das Gel mit dem Elektrophoreselaufpuffer (1x TAE) und entnimmt den Kunststoffkamm. 8 μ l der PCR Produkte werden mit 2 μ l 5 x TAE-Auftragspuffer gemischt. Der Blaumarker im Auftragspuffer dient zur Orientierung über die Lauflänge der Proben. Mit den Proben wird ein DNA-Längenstandard aufgetragen, der aus einem Gemisch von DNA-Fragmenten bekannter Längen besteht (GeneRuler™ DNA Ladder Mix von MBI Fermentas, St Leon Roth). Dieser Längenstandard ermöglicht das Abschätzen der Fragmentlängen der Proben. Nach der Elektrophorese werden die DNA Banden im Gel für 10 Minuten in einem Ethidiumbromidbad angefärbt, überschüssiges Ethidiumbromid wird durch zehnminütiges Waschen im Wasserbad entfernt.

Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der unter UV Licht gelborange erscheint. Er färbt durch Interkalieren zwischen die Basenpaare der DNA diese spezifisch an. Danach werden analytische Gele unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm

mit einer Polaroid-Sofortbildkamera fotografiert, präparative Gele werden bei 320 nm Wellenlänge betrachtet und weiter bearbeitet.

3.10 DNA Verdau mit Restriktions Enzymen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen kann man doppelsträngige DNA sequenzspezifisch schneiden.³⁹ Es handelt sich dabei um eine Gruppe bakterieller Enzyme, die an spezifische Erkennungssequenzen binden und dort die DNA hydrolytisch spalten. Der Restriktionsverdau ist eine sehr einfache und schnelle Methode, um die Spezifität von DNA zu kontrollieren. Die Anzahl der Schnittstellen innerhalb der Sequenz ergibt die Anzahl der erwarteten Fragmente in der Agarose-Gelelektrophorese. Ist in der Sequenz nur eine Schnittstelle enthalten, zeigen sich im Gel zwei Fragmente, deren addierte Gesamtlänge der Ursprungslänge der Sequenz entspricht.

Definitionsgemäß kann eine Einheit Enzym 1 µg DNA in einer Stunde bei 37°C schneiden. Um sicherzugehen, dass die komplette DNA verdaut wird, wurde das zehnfache der errechneten Enzymmenge eingesetzt.

Beispiel für einen Restriktionsansatz:

10 µg DNA

5 µl 10 x Restriktionspuffer

100 U Restriktionsenzym

ad 50 µl H₂O

bei 37°C für 1 Stunde

Soll die DNA gleichzeitig mit zwei Restriktionsenzymen verdaut werden, darf die gesamte Enzymmenge nicht 10 % des Ansatzes überschreiten. Die Reaktionsdauer muss je nach Enzym- und DNA-Menge bestimmt werden. Der verwendete Puffer ist so auszuwählen, dass er für beide eingesetzten Enzyme möglichst optimale Reaktionsbedingungen schafft. Ist bei dem verwendeten Enzym eine Exonuklease Aktivität bekannt, sollte die vom Hersteller angegebene maximale Inkubationsdauer nicht überschritten werden.

3.11 Topo TA Klonierung

Die Topo TA Klonierung⁴⁰ ermöglicht eine direkte Insertion des mit Taq Polymerase amplifizierten PCR Produkts in einen Plasmid Vektor. Es wurde der Plasmid Vektor pCR II –TOPO (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, der am 3' Ende einen Thymidin Überhang besitzt und kovalent an die Topoisomerase I gebunden ist. Eine Abbildung des verwendeten Vektors befindet sich im Anhang unter A8. Die Taq Polymerase bindet durch ihre terminale Transferase Aktivität ein dATP an das 3' Ende des PCR Produkts, wodurch der effiziente Einbau in den Vektor gewährleistet ist. Zur Klonierung wird die Topoisomerase I vom Vaccinia Virus verwendet. Sie bindet an doppelsträngige DNA und schneidet spezifisch nach 5'-CCCTT die Phosphodiesterbindungen in einem der Stränge. An das 3' Ende des geschnittenen Stranges wird in Form einer kovalenten Bindung ein Tyrosinrest (TYR-274) der Topoisomerase gebunden. Die Phosphotyrosylbindung zwischen Vektor und Enzym kann durch die 5'-Hydroxylgruppe des PCR Produktes aufgebrochen werden, wodurch es zur Insertion des PCR Produktes in den Vektor und zum Freiwerden der Topoisomerase kommt. Bei der Herstellung des PCR Produktes ist es wichtig, auf den 3' Adenin-Überhang zu achten. Die Amplifizierung erfolgt nach dem unter Polymerasekettenreaktion erläuterten Prinzip. Je 10 µl des PCR Produktes werden in einer Agarosegel Elektrophorese auf ihre Reinheit überprüft. Bei der TOPO Klonierungsreaktion werden für die chemische Transformation 0.5-4.0 µl des PCR Produktes, 1 µl einer Salzlösung (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl₂), 1 µl TOPO Vektor und steriles Wasser bis zu einem endgültigen Volumen von 6 µl verwendet. Man lässt den Ansatz zunächst für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren und stellt ihn danach auf Eis. Kompetente E. coli (One Shot Top 10, Invitrogen, Karlsruhe) werden auf Eis aufgetaut, man gibt 2 µl der TOPO Cloning Reaction dazu und lässt den Ansatz für weitere 30 Minuten auf Eis inkubieren. Nach der Inkubation werden die Zellen zunächst für 30 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und direkt danach auf Eis gelegt, worauf nach Zugabe von 250 µl SOC Mediums die Proben für eine Stunde bei 37°C geschüttelt werden. 50 µl jeder Transformation werden auf X-Gal und 50-100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin enthaltenden LB Platten ausgestrichen und inkubieren über Nacht bei 37°C. Zur Analyse der Klone pickt man ca. 10 weisse Kolonien. Nach Kultivierung in LB Medium mit Ampicillin oder Kanamycin wird die Plasmid DNA wie beschrieben mit dem E.Z.N.A. MiniPrep der

Firma PeqLab, Erlangen, isoliert und die DNA durch einen Restriktionsansatz mit EcoR1 oder durch Sequenzierung analysiert.

3.12 DNA Sequenzierung

Die DNA wurde nach der Didesoxy- Kettenabbruchmethode von Sanger, Nicklen und Coulson⁴¹ sequenziert.

An einzelsträngiger DNA synthetisiert eine DNA-Polymerase den neuen DNA-Strang. Im Ansatz sind neben den Desoxynukleotiden dATP, dGTP, dCTP und dTTP auch die Didesoxynukleotide ddATP, ddGTP, ddCTP und ddTTP enthalten, denen neben der 2' Hydroxyl- auch die 3' Hydroxylgruppe fehlt. Diese 3' Hydroxylgruppe wird zur Phosphodiesterbindung benötigt, so dass es nach Einbau eines Didesoxynukleotids zum Strangabbruch kommt und somit die Synthese der DNA Kette abgebrochen wird.

Ob ein dNTP oder ein ddNTP eingebaut wird, ist zufällig verteilt und ist vom Konzentrationsverhältnis von dNTPs zu ddNTPs abhängig. So kommt es zu unterschiedlich langen Strängen deren letzte Base jeweils ein Didesoxynukleotid ist, das zum Strangabbruch geführt hat. Im Polyacrylamidgel werden die Fragmente elektrophoretisch nach ihren Längenunterschieden bis auf eine Base genau aufgetrennt. Sind die ddNTPs z.B. radioaktiv oder mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, kann man die genaue Position jeder Base und somit die DNA Sequenz bestimmen.

Die Sequenzierungsreaktion wurde als „Cycle–Sequenzierung“ mit dem Prism Ready Reaction Dye Terminator Reagenz (Perking Elmer, Langen) durchgeführt. Der mitgelieferte „Premix“ enthält Taq–Polymerase, so daß ein zur PCR analoges 3–Temperatur–Verfahren mit DNA–Doppelstrangdenaturierung, Sequenzprimer-anlagerung und Polymerisationsreaktion durchgeführt werden kann.

Ein 20 µl Sequenz Reaktions Ansatz besteht aus:

8 µl	Dye Terminator Ready Reaction Mix
1 µl	Sequenzierungsprimer(5 µM)
20-1000 ng	Template DNA
ad 20 ml	H ₂ O

Temperatur Profil:

25 Zyklen x (96°C für 10 sec, 50°C- 60°C für 5 sec, 60°C für 4 min)

4°C Lagerungstemperatur

Die optimale Temperatur für die Primeranlagerung hängt vom Schmelzpunkt des Primers ab.

Der Reaktionsansatz wird durch eine Ethanol-fällung gereinigt, bei der zunächst zu jedem Ansatz ein Gemisch aus 2 µl NaAc (3M, pH 4.6) und 50 µl 95%iges Ethanol gegeben wird. Nach zehnmütiger Lagerung der Proben auf Eis und 30 minütigem Zentrifugieren bei 20000 x g werden die gefällten Proben mit 70%igem Ethanol gewaschen, danach trocknet man die Pellets für 7 min in einer Vakuumzentrifuge. Kurz vor dem Auftragen auf das Gel werden die Pellets in 4 µl Formamid mit 5 mM EDTA und 1 µl Blue Dextran (Perkin Elmer, Langen) gelöst und für 2 min bei 92°C denaturiert.

Das Gel besteht aus 30 g Harnstoff, 9 ml 40%iges Acrylamid, 6 ml 10 x TBE Puffer und 23,5 ml H₂O. Vor dem Giessen werden noch 180 µl 10% iges Ammonium Persulfat und 24 µl TEMED zugegeben. Die Polymerisierung dauert ca. 2h. Die vertikale Elektrophorese wurde am automatischen Sequencer 373A (ABI/ Perkin-Elmer, Langen) durchgeführt. Dabei wurden die fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide mit einem Argonlaser, dessen Hauptemission bei 488 nm und 514 nm liegt, angeregt. Die Sekundärstrahlung der markierten DNA-Fragmente wurde über einen Photomultiplier an ein angeschlossenes Computersystem geleitet und direkt in DNA-Sequenzdaten umgesetzt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Computerprogrammes OMIGA (Oxford Molecular, Oxford, UK) analysiert und ausgewertet.

3.13 Yeast Two-Hybrid System

Das Two-Hybrid System dient dazu, spezifische Protein-Protein Interaktionen in vivo in Hefezellen zu testen.^{42,43,44}

Two Hybrid Systeme beruhen auf der Tatsache, dass Transkriptions-Regulatoren aus separablen, funktionell unabhängigen Domänen bestehen, der DNA-Bindungsdomäne (DNA-BD) und der Aktivierungsdomäne (AD). Man kann diese beiden Domänen voneinander trennen und mit verschiedenen Proteinen fusionieren,

deren Interaktion man testen möchte. Das an die DNA-BD gebundene Protein wird dabei als Köder bezeichnet, das mit der AD fusionierte hingegen als Beute. Die DNA-BD bindet an eine spezifische Promotorsequenz. Das ist die Voraussetzung dafür, dass die AD die RNA-Polymerase II aktivieren kann, um das Gen downstream der Bindungsstelle zu transkribieren. Einzelne bewirkt weder die DNA-BD noch die AD eine Transkription des nachfolgenden Gens. Generell kann jede beliebige DNA-BD mit jeder beliebigen AD kombiniert werden, meistens jedoch sind beide Teil desselben Proteins.

In dieser Arbeit wurde das Matchmaker LexA Two Hybrid System der Firma Clontech (Palo Alto, USA) eingesetzt. Die eingesetzten Vektoren befinden sich im Anhang unter A8.

Die hier verwendete DNA-BD ist Teil des prokaryotischen LexA Proteins und fungiert normalerweise als Repressor von SOS Genen in *E.coli*.⁴⁵ Hier wird sie unter Zuhilfenahme des pLexA Hefe-Expressionsvektors mit den zu untersuchenden Genen (*GRAF* Wildtyp und *GRAF* Mutanten) fusioniert. Der pLexA Vektor trägt den ADH1 Promotor, der die Expression des Fusionsgenes kontrolliert und den HIS3 Transformationsmarker. Dieser HIS3 Transformationsmarker ermöglicht den Hefezellen, selbst Histidin zu produzieren und somit auf Medium zu wachsen, das kein Histidin enthält.

Das Fusionsprodukt bindet sowohl an den pLexA-Operator eines Reportergenes (*Leu2*) im Hefegenom, als auch an den pLexA-Operator des Reporterplasmids (hier p8op-lacZ), kann jedoch wie zuvor erklärt die Transkription der nachgeschalteten Gene ohne die Aktivierungsdomäne nicht aktivieren.

Die AD ist ein 88 Aminosäuren langes *E.coli* Peptid. Mit ihr werden die potentiellen Interaktionspartner fusioniert. Dazu wird das Hefe-Expressionsplasmid pB42AD verwendet, das den TRP1 Transformationsmarker trägt. Zellen, die diesen Transformationsmarker tragen, sind also in der Lage, selbst Tryptophan zu synthetisieren. Die Expression des Fusionsproduktes wird vom induzierbaren Gal1-Promotor kontrolliert und erfolgt lediglich auf Galaktose und Raffinose enthaltendem Medium in Abwesenheit von Glukose.

Die rekombinanten Hybrid-Proteine der Köder- und Beutekonstrukte werden in Hefen koexprimiert. Eine Interaktion zwischen einem Target Protein, das an die DNA-BD gebunden ist, und einem an die AD gebundenen Protein schafft einen neuen Transkriptions-Aktivator. Bei dem Reporterplasmid handelt es sich um p8op-lacZ,

dessen lacZ Reporter gen von 8 LexA Operatoreinheiten und der TATA Region des induzierbaren GAL1 Promotors kontrolliert wird. Bei der Translation des Reporter gens wird β -Galaktosidase gebildet, die das Laktoseanalogon X-Gal, das den Induktionsplatten zugesetzt ist, zu einem dunkelblauen Reaktionsprodukt abbaut. Interagieren die Köder- und Beutekonstrukte, wird das Reporter gen LacZ translatiert und es kommt durch den Abbau von X-gal zur Blaufärbung der Kolonie. Zur Zusammensetzung der Induktionsplatten siehe A 10.

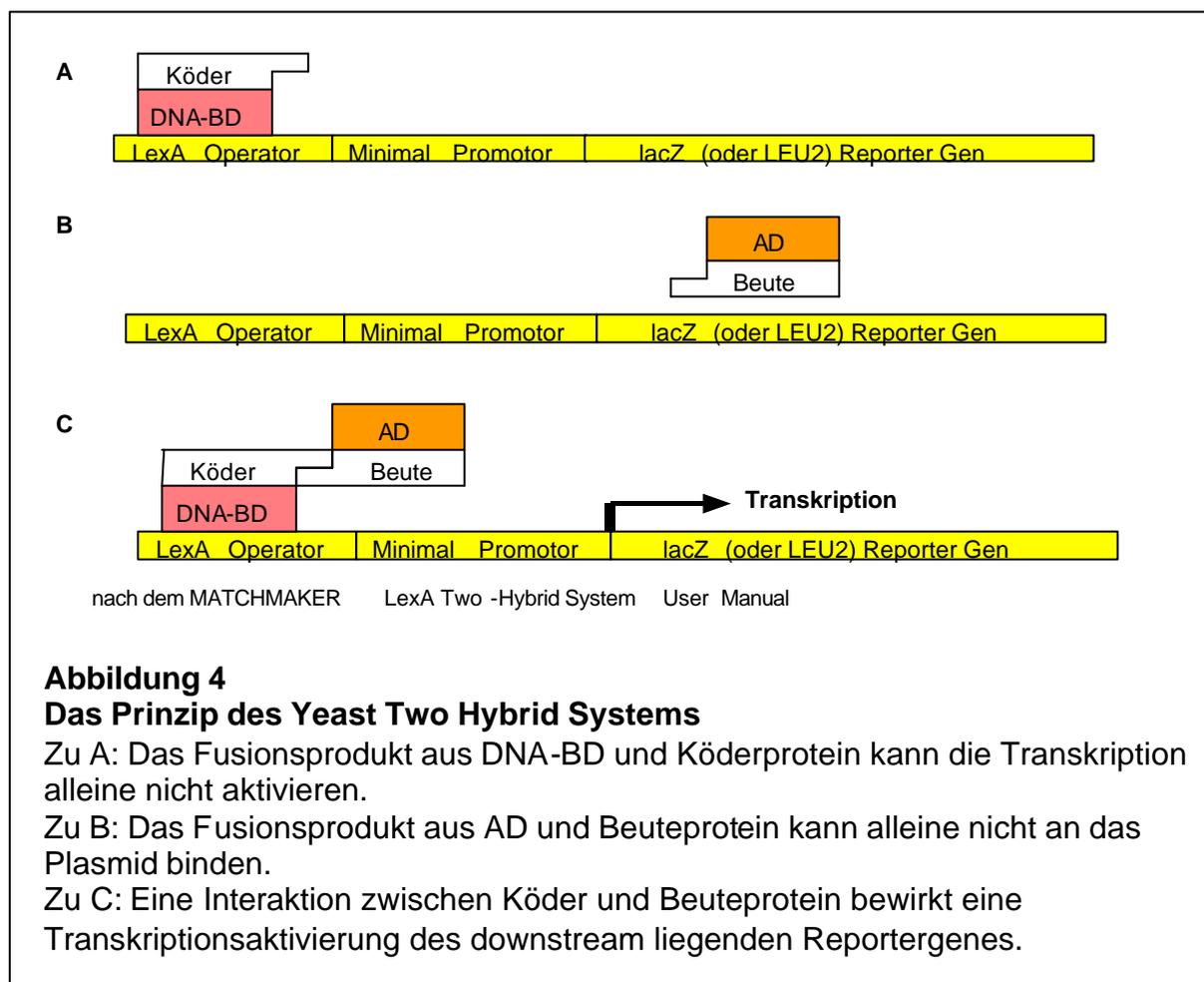


Abbildung 4
Das Prinzip des Yeast Two Hybrid Systems

Zu A: Das Fusionsprodukt aus DNA-BD und Köderprotein kann die Transkription alleine nicht aktivieren.

Zu B: Das Fusionsprodukt aus AD und Beuteprotein kann alleine nicht an das Plasmid binden.

Zu C: Eine Interaktion zwischen Köder und Beuteprotein bewirkt eine Transkriptionsaktivierung des downstream liegenden Reporter gens.

3.13.1 Hefekulturen

Die Kultivierung erfolgte immer bei 30°C. Neben dem YPD-Medium, das alle zum Vermehren der Hefezellen erforderlichen Zusätze enthält, wurden verschiedene Synthetical-Dropout (SD)-Medien verwendet, denen bestimmte Zusätze fehlen. Durch den Einsatz dieser SD-Medien ist also eine Selektion der für den fehlenden Zusatz auxotrophen Hefezellen möglich.

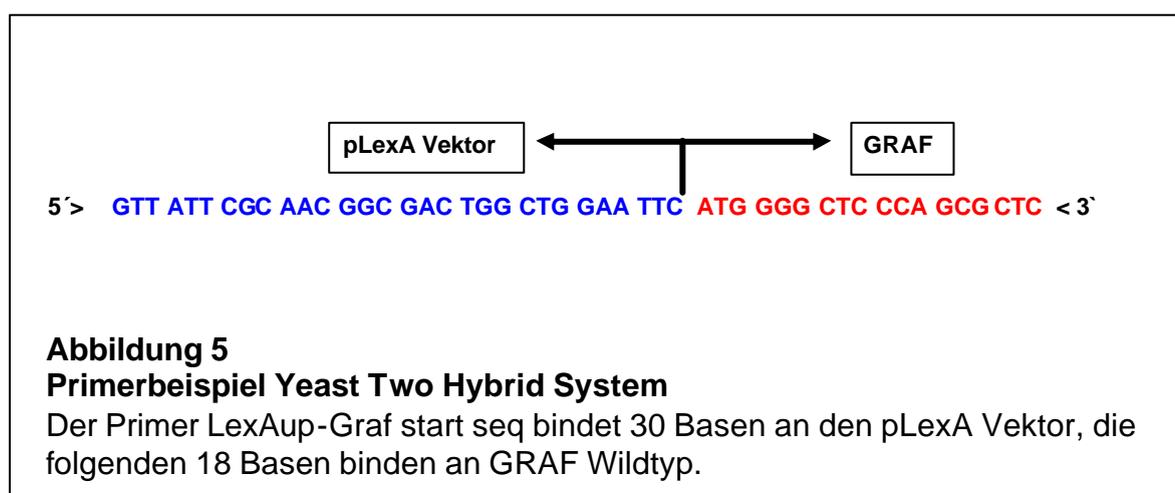
Die Zusammensetzung der Medien befindet sich im Anhang unter A9.

3.13.2 Herstellung der Köderkonstrukte

Der *GRAF* Wildtyp und die *GRAF* Mutanten wurden durch homologe Rekombination in den pLexA Vektor in Hefezellen des Stammes EGY 48 [p8op-LacZ] inkloniert.⁴⁶

Dazu benötigt man zunächst den Vektor in linearisierter und dephosphorylierter Form. Die Linearisierung erfolgt durch eine Restriktion mit EcoR1. Der geschnittene Vektor wird in einem Agarosegel von den übrigen Zusätzen des Restriktionsansatzes getrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem GFX™ PCR and Gel Band Purification Kit (Amersham, Little Chalfont, UK) gereinigt. Danach wird er unter Verwendung von CIP der Firma Roche (Mannheim) bei einer Inkubation bei 37°C für 30 min dephosphoryliert.

Neben dem linearisierten und dephosphorylierten Vektor benötigt man das Insert, welches das zu untersuchende Gen enthält und an beiden Enden homolog zur Vektor Sequenz ist. Dies erreicht man durch eine Amplifizierung des entsprechenden Genes durch PCR mit Primern, die an den Enden des zu transformierenden Genes binden und zusätzlich noch pLexA Sequenzen tragen, die der EcoR1 Schnittstelle (GAA TTC) benachbart sind. Der in dieser Arbeit verwendete Sense Primer besteht an seinem 5' Ende aus 30 bp pLexA Sequenz (Base 2118-2147), in denen die EcoR1-Schnittstelle enthalten ist. Daran schliessen sich 18 bp Insertsequenz. Am 5' Ende des Antisense Primers stehen 31 bp der pLexA-Sequenz (Base 2148-2178), die direkt neben der EcoR1 Schnittstelle binden. Der Primerteil, der an das *GRAF* Gen bindet, besteht aus 26 bis 28 bp.



Als Template für diese PCR wurde *GRAF* Wildtyp cDNA (GenBank Accession Y10388) von Herrn Dr. Stig Bojesen, Kopenhagen, in den Vektor pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Aus Patientenmaterial klonierte ich durch TOPO TA Cloning die *GRAF* Mutanten enthaltende cDNA in den TOPO II Vektor. Die Amplifikation der Inserts erfolgte durch eine PCR mit Pfu-Polymerase. Die Annealingtemperatur dieser Primer errechnet sich lediglich aus dem Primerteil, der an die Plasmid-DNA bindet.

Herstellung des Köderkonstruktes und seine Transformation sind in einem Schritt möglich, indem man zum Transformationsansatz statt 0,1 µg DNA-BD 200 ng gereinigtes PCR Produkt und 50 ng linearisierten und dephosphorylierten pLexA Vektor zugibt. Als Positivkontrolle diente der *GRAF* Wildtyp als Köderkonstrukt. Als Negativkontrolle wurde pB42AD nativ verwendet.

3.13.3 Herstellung der Beutekonstrukte

Die Beutekonstrukte bekannter Induktionspartner von *GRAF* wurden freundlicherweise von Frau Dr. Uta Fuchs, Kinderklinik Giessen, zur Verfügung gestellt. Sie gewann sie durch Screenen einer cDNA- Bibliothek mit *GRAF* als Köder. Dazu wurde die vollständige *GRAF* Sequenz in pLexA einkloniert und in EGY [p8op-LacZ]- Hefezellen transformiert. Diese Hefen wurden mit einer humane n cDNA Bibliothek aus Plazenta-Gewebe (Clontech, Palo Alto, USA) transformiert. Die Co-Transformanten wurden zunächst auf SD/-His/-Ura/-Trp kultiviert, danach im β-Galaktosidase-Assay auf SD/ Gal/ Raf/ -His/-Ura/-Trp/-Leu auf eine Interaktion zwischen Köder und Beute sowie auf eine Expression des LacZ-Gens des Reporterplasmids selektiert. Die positiven, d. h. mit *GRAF* interagierenden Klone wurden sequenziert und mit der Hilfe des Programmes BLAST Search identifiziert. Die Beutekonstrukte bestanden aus der AD fusioniert mit den *GRAF*-Interaktionspartnern CD 14,^{47,48} FBLN1, WNT7A,^{49,50} KIAA0583,⁵¹ MAGOH, FAK2,^{52,53} HAT 1,⁵⁴ TRPM 2^{55,56} und PIK3R1.^{57,58}

Frau Dr. Fuchs hatte in einer ihrer Arbeiten bereits nachgewiesen, dass *GRAF* mit den oben genannten Sequenzen im Yeast Two Hybrid Assay interagiert.

3.13.4 Entwicklung von Fusionsproteinen

Um das Fusionsprotein aus pLexA und *GRAF* Wildtyp mit den Produkten aus pLexA und den *GRAF* Mutanten zu vergleichen, wurde zunächst der exakte Einbau der

Inserts in den pLexA Vektor durch einen Restriktionsansatz mit den Enzymen Eco R1 und Not1 überprüft.

Zur Kontrolle, ob die Inserts an der richtigen Stelle des Vektors im richtigen Reading Frame eingebaut wurden, sequenzierte ich die Plasmid DNA unter Verwendung von Vektorprimern, die am pLexA Vektor binden und das Insert flankieren. Die Sequenz der Vektorprimer Lex A seq up 1985 und Lex A seq do 2310 wird ebenfalls im Anhang unter A6 dargestellt.

```

GAT CTT CGT CAG CAG AGC TTC ACC ATT GAA GGG CTG GCG GTT GGG GTT

                pLexA                GRAF Mutante
ATT C AAC GGC GAC TGG CTG GAA TTC  ATG GGG CTC CCA GCG CTC GAG

TTC AGC GAC TGC TGC
  
```

Abbildung 6

Auszug aus dem Sequenzierungsergebnis einer Transformationskontrolle.

In Rot ist die pLexA-Vektorsequenz in ihrem Leserahmen dargestellt.

Die grüne Schrift kennzeichnet den Beginn der Insert Sequenz. Wie man sieht, ist die GRAF Mutante so in den Vektor transformiert, dass sie im ursprünglichen ORF abgelesen werden kann.

Die Größe der Fusionsproteine kontrollierten wir mittels Westernblot. Da die Größe des LexA Proteins 22 KD und die des GRAF Proteins 86 KD beträgt, erwarteten wir ein Fusionsprotein der Größe 108 KD. Die Klone 4, 8 und 11 bestehen aus je 180, 211 und 97 Codons, so dass man bei einem ungefähren Gewicht von 110 D pro AS von Fusionsproteinen der Größe 42 KD, 45 KD und 33 KD ausgehen kann.

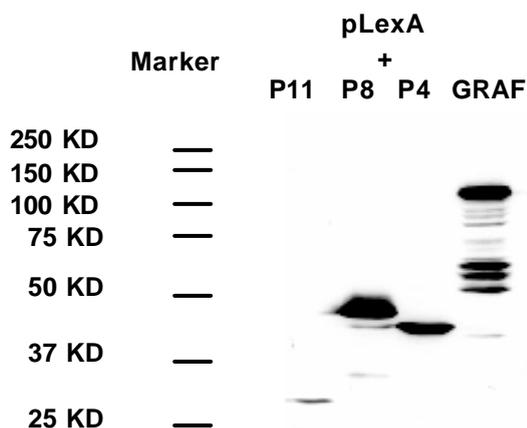


Abbildung 7

Westernblot der Fusionsproteine von pLexA mit GRAF Wildtyp und den Klonen 11, 8 und 4.

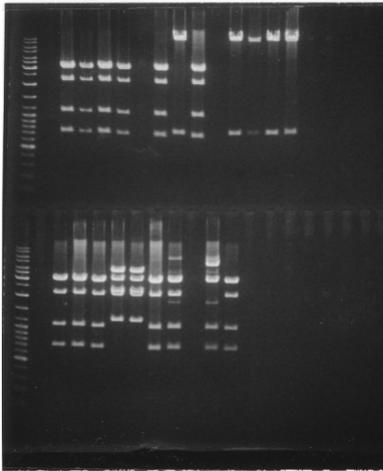
Eine Interaktion der beschriebenen Proteine mit den GRAF Mutanten zeigt sich beim Züchten der Co-Transformanten auf Induktionsplatten.

3.13.5 Transformation in Hefezellen

Im Two Hybrid System wurde der Leu- auxotrophe Reporterstamm EGY48 [p8op-LacZ] verwendet, der bereits das Reporterplasmid p8op-lacZ enthält. Die Hefezellen wurden zunächst auf YPD-Agar über 2 bis 3 Tage herangezüchtet. Nach dem Lösen einiger Kolonien in 1 ml YPD-Medium und dem Überführen in 50 ml YPD-Medium wurden sie bei 30°C für 12-18 h bei 250 rpm geschüttelt bis eine $OD_{600} > 1,5$ erreicht war. Dieser Ansatz wurde in 300 ml YPD-Medium überführt und für weitere 3h bei 30°C und 250 rpm kultiviert bis die $OD_{600} 0,5 \pm 0,1$ entsprach. Durch Zentrifugieren bei 1000 x g für 5 min wurden die Zellen pelletiert und durch Resuspension in 50 ml sterilem H₂O und erneutem Zentrifugieren (1000 x g, 5 min) gewaschen. Die Zellen wurden danach in 1,5 ml TE/LiAc gelöst.

Ein Transformationsansatz setzt sich aus 0,1 µg Köderkonstrukt (hier pLexA+ *GRAF* Wildtyp bzw. *GRAF*-Mutant), optional 0,1 µg Beutekonstrukt (hier pB42 + potentielle Interaktionspartner), 0,1 mg Herring Testes Carrier DNA und 100 µl der kompetenten Hefezellen zusammen. Nach dem Mischen dieses Ansatzes gibt man 600 µl PEG / LiAc-Lösung dazu und mischt erneut durch Vortexen. Nach einer Inkubation von 30 min bei 30°C und 200 rpm fügt man den Zellen 70 µl DMSO hinzu, mischt erneut und setzt die Zellen dann einem Hitzeschock für 15 min bei 42°C aus. Nach dem Hitzeschock kommen die Zellen für 2 min auf Eis und werden dann bei 1000 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die pelletierten Hefen in 300- 500 µl 1 x TE gelöst. Hat man lediglich das Köderkonstrukt transformiert, werden die Zellen auf SD/ -His/ -Ura ausgestrichen, möchte man Co-Transformanten selektieren, werden SD/ -His/-Ura/-Trp Platten verwendet. Die Platten inkubiert man bei 30°C zwei bis drei Tage.

Zur Transformationskontrolle pickten wir einige der gewachsenen Kolonien, isolierten die Plasmid-DNA aus den Hefezellen und transformierten sie in TOP 10 Zellen. Um unterscheiden zu können, ob die E.coli Transformanten pLexA oder das Reporterplasmid enthalten, wurde auch hier die Plasmid DNA isoliert und mit EcoR1 und Not1 geschnitten. Beim Verdau von pLexA mit erfolgreicher Rekombination entstehen zwei Banden, Vektor und Insert, bei religiertem pLexA ist lediglich eine Bande zu sehen, beim Verdau des Reporterplasmids vier Banden.

**Abbildung 6****Restriktion der Transformationskontrolle mit Eco R1 und Not 1.**

Bei Einbau des Inserts erhält man zwei Banden, eine mit ca. 10 kb, die dem pLexA-Vektor entspricht, und das Patienteninsert. Wurde kein Insert eingebaut, ist lediglich die Bande des geschnittenen Vektors pLEXA bei 10 kb zu sehen, erhält man vier Banden der Längen 3,5 kb, 2,4 kb, 1,5 kb und 0,8 kb stammt die isolierte DNA vom Reporterplasmid. In der ersten Spur wurde der DNA Größenstandard GeneRuler® (MBI Fermentas, St. Leon Roth) aufgetragen.

3.13.6 Plasmid DNA Isolation aus Hefezellen

Zur Plasmid DNA Isolation aus den Hefezellen⁵⁹ wurde das YEASTMAKER Yeast Plasmid Isolation Kit und CHROMA SPIN-1000 DEPC-H₂O Säulen der Firma Clontech (Palo Alto, USA) verwendet. Zur Herstellung einer flüssigen Hefekultur pickt man einzelne Kolonien und lässt sie über Nacht bei 30°C und 250 rpm in dem entsprechenden SD Medium inkubieren. Wir isolierten die Plasmid DNA aus den Hefen nach der ersten Transformation, d.h. die Zellen enthielten neben dem Reporterplasmid den pLexA Vektor und waren dadurch in der Lage, Histidin und Uracil selbst zu synthetisieren, so dass wir SD/-His/-Ura als Kulturmedium verwendeten. Nach der Inkubation werden die Zellen durch Zentrifugieren bei 10000 x g, 4°C für 5 min pelletiert, der Überstand wird verworfen und die Zellen in der verbliebenen Flüssigkeit (ca. 50 µl) resuspendiert. Zu jedem Ansatz gibt man 10 µl Lyticase Lösung und inkubiert bei 37°C für 60 min. Danach gibt man in jedes Cup 10 µl 20% SDS und vortext stark für 1 min. Optional kann man die Zellen einem Einfrier-Auftauzyklus unterziehen, um die komplette Lyse der Zellen zu gewährleisten. Für jede Plasmid DNA Präparation wird eine CHROMA SPIN-1000 DEPC-H₂O Säule mehrmals gevortext und invertiert bis die darin enthaltene Gel-Matrix völlig gelöst ist. Man entfernt die Spitze und den Deckel der Säule, stellt sie in ein sauberes 2 ml Polypropylen Tube und lässt durch Zentrifugieren bei 700 x g für 5 min den Puffer durch die Membran passieren. Auf das über der Membran verbleibende Gelbett gibt man die lysierten Zellen und erhält die gereinigte DNA nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 700 x g für 5 min. Die Plasmid DNA kann bei -20°C aufbewahrt werden.

3.13.7 Herstellung von Hefeextrakten für Western-Blots

Zur Herstellung der Proteinextrakte^{60, 61} werden zunächst mehrere Kolonien von mit *GRAF* Wildtyp bzw *GRAF* Mutanten transformierten Hefen in 5 ml SD/-His/-Ura Medium über Nacht bei 30°C und 250 rpm kultiviert. Als Negativkontrolle dienen unbehandelte Hefen vom Stamm EGY 48 in 10 ml YPD- Medium. Nach kurzem Vortexen werden diese Kulturen in 50 ml YPD-Medium überführt und für weitere 3 bis 4 h wie zuvor inkubiert bis sie eine OD₆₀₀ von 0,5 ± 0,1 erreicht haben. Die Zellkulturen werden auf jeweils zwei halb mit Eis gefüllten 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und für 5 min bei 1000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in 50 ml Eiswasser resuspendiert und erneut wie zuvor zentrifugiert. Das Pellet wird nach Entfernen des Überstandes in flüssigem Stickstoff eingefroren und kann bis zur weiteren Verwendung bei -70°C aufbewahrt werden. Für die Proteinextraktion wird pro Präparation 1 ml Cracking Buffer Stock Solution mit 10 µl β-Mercaptoethanol versetzt und auf 60°C erwärmt. Pro 7,5 OD₆₀₀ der Hefezellen werden 100 µl Puffer verwendet. Durch Zugabe des Cracking Puffers werden die Zellpellets aufgetaut und resuspendiert. In ein neues Reaktionsgefäß gibt man pro 7,5 OD₆₀₀ 80µl Glass Beads (425-600 µm der Firma SIGMA, Steinheim, Deutschland) und pipettiert darauf die Suspension. Um die Zellen zu zertrümmern und membranassoziierte Proteine freizusetzen, inkubiert man den Ansatz zunächst für 10 min bei 70°C und vortext danach für 1 min bei hoher Geschwindigkeit. Im nächsten Schritt wird für 5 Minuten bei 20000 x g und 4°C zentrifugiert, um die Zelltrümmer und nicht lysierte Zellen von der die Proteine enthaltende Lösung zu trennen. Dieser Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Das verbliebene Pellet wird bei 100°C für 3 bis 5 Minuten gekocht, eine Minute stark gevortext und wie zuvor zentrifugiert. Dieser zweite Überstand wird mit dem ersten zusammengeführt. Zu den fertigen Proben gibt man 2x nicht reduzierenden Auftragspuffer, inkubiert bei 90°C für 5 min und kann sie dann direkt auf ein SDS Gel laden.

3.13.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)⁶² können Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden. Das SDS bildet dabei Komplexe mit den Proteinen in konstantem Ladungs/ Masse Verhältnis, so dass die ursprünglich unterschiedlichen Ladungen der Proteine aufgehoben werden und die Auftrennung der Proteine nun nur nach ihrer Größe erfolgen kann. Bei der SDS-PAGE kommen

zwei unterschiedliche Gele zum Einsatz: das eigentliche Trenngel und darüber das weniger konzentrierte Sammelgel mit niedrigerem pH-Wert. In dieser Arbeit wurde ein 10 %iges SDS-PAGE Gel eingesetzt.

Zusammensetzung des Trenngels (10%):	H ₂ O	4,0 ml
	30% Acrylamid/ Bisacrylamid	3,3 ml
	1,5M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml
	10% SDS	100 µl
	10% Ammoniumpersulfat	100 µl
	TEMED	4 µl

Aus 10 ml kann man zwei Gele für das Mini Protean II Elektrophorese System (Firma BioRad, München) giessen. Nach 20 Minuten ist das Gel vollständig polymerisiert und das Sammelgel kann darüber aufgetragen werden. In das noch flüssige Gel wird der Probenkamm eingesetzt, der wie beim Agarose Gel als Raumhalter für die Proben fungiert.

Zusammensetzung des Sammelgels (5%):	H ₂ O	2,7 ml
	30% Acrylamid/ Bisacrylamid	0,67 ml
	1,5M Tris-HCl pH 8,8	0,5 ml
	10% SDS	40 µl
	10% Ammoniumpersulfat	40 µl
	TEMED	4 µl

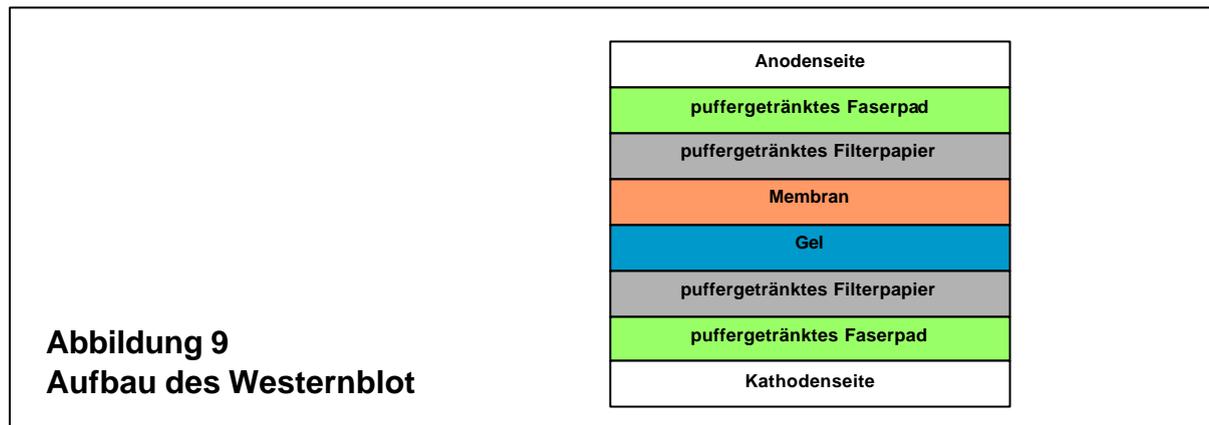
Vor dem Auftragen der Proteinproben wurden sie mit dem doppeltem Probenvolumen an nicht reduzierendem Auftragspuffer versetzt und bei 90°C für 5 min denaturiert. Es wurde von jeder Probe 20 µl sowie ein vorgefärbter Protein-größenstandard aufgetragen. Bis zum Erreichen der Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel lief die Elektrophorese bei 20 mA, danach bei 25 mA. Die gesamte Laufzeit betrug 1h.

3.14 Westernblot

Der Westernblot^{63,64} wurde unter Verwendung des Mini Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell Kits (BioRad, München) und des ECLTM Western Blotting Detection Systems (Amersham, Little Chalfont, UK) durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurden sowohl das Gel als auch die Nitrocellulose-Membran für 15 min bei Raumtemperatur in CAPS-Protein Transferpuffer unter Bewegung inkubiert.

Der Blot besteht aus folgenden Schichten:



Er wird in die mit eiskaltem CAPS-Protein-Transferpuffer gefüllte Blotkammer eingesetzt. Das Blotten erfolgte bei 100 V und maximal 350 mA für 1 h. Nach dem Blotten werden auf der Membran die Banden des Protein-Größenstandards mit Bleistift nachgezogen. Die folgenden Inkubationsschritte erfolgen alle unter Bewegung und bei Raumtemperatur. Um alle unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren, wird die Membran zunächst für 30 min mit 1 x Roti[®]-Block (Firma Roth, Karlsruhe) inkubiert. Danach wird sie mit TBST gespült. Der spezifische erste Antikörper, hier Anti-LexA (2-12) Mouse Monoclonal IgG₁ 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, Californien, USA) wurde in einer Mischung von 1,5 % Magermilchpulver in TBST(w/v) in einer 1:1000 Verdünnung gelöst. In 20 ml dieser Lösung wurde der Blot für 1 h inkubiert, mit TBST zunächst gespült, dann für 5 min gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde der Anti Mouse Antikörper Goat Anti Mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Californien, USA) verwendet, der mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiert ist. In 20 ml der Antikörper-Magermilchlösung in 1:5000 Verdünnung inkubiert der Blot für weitere 30 min. Dann wird die Membran viermal für 5 min in TBST gewaschen und nochmals mit TBST gespült, um nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen.

Zum Nachweis des gebundenen Sekundärantikörpers wird der Blot 1 Minute mit einer Mischung aus je 2 ml der Lösungen 1 und 2 des ECL[™] Western Blotting Detection Systems inkubiert. Diese Lösungen enthalten Wasserstoffperoxid, mit dessen Hilfe die an den Sekundär-Antikörper gebundene Peroxidase unter alkalischen Bedingungen Luminol oxidiert. Dabei wird Licht mit einer Wellenlänge von 428 nm freigesetzt, das mit einem Autoradiographiefilm (Hyperfilm ECL,

Amersham, Little Chalfont, UK) aufgenommen werden kann, der in einem Röntgenfilmentwickler (Agfa, Köln) entwickelt wird.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung der genomischen Struktur des *GRAF* Gens

Die Amplifizierung der Exon-Intron-Übergänge in dieser Arbeit soll eine genaue Bestimmung der Größe und Zahl der Exons des *GRAF* Gens sowie seiner Exon-Exon Grenzen auf cDNA Ebene ermöglichen.

Um die Struktur des *GRAF* Gens genauer zu untersuchen, verwendete ich die Zelllinien HL60, MV 4-11 und K562, die den *GRAF* Wildtyp enthalten, und amplifizierte aus der genomischen DNA durch Polymerasekettenreaktion die einzelnen Exons in voller Länge mit den jeweiligen Exon-Intron-Übergängen. Sowohl die sense als auch die antisense Primer flankierten die Exons in einem Abstand von ca. 70 bp, so dass etwa 50 bp Intronsequenz vor und nach dem jeweiligen Exon amplifiziert wurden. Zum Design der Primer wurde auf die Gendatenbank der Klone AC008533, AC012630, AC005348 und AC004782 von NCBI zurückgegriffen, siehe A5. Die Größe und Sequenz der *GRAF* Exons veröffentlichte ich unter den Accessionnummern AJ309467 bis AJ309487 und AF508552 in der Gendatenbank.

Tabelle 6

Übersicht über die Exons des *GRAF* Gens mit der jeweiligen Accessionnummer sowie die diese Sequenz enthaltenden Klone der Datenbank.

Exon des <i>GRAF</i> Gens	Accessionnummer des <i>GRAF</i> Exons	Accessionnummer der Klone
1		AC008533
2		AC008533
3	AJ309467	AC008533
4	AJ309468	AC008533
5	AJ309469	AC008533
6	AJ309470	AC008533, AC012630
7	AJ309471	AC008533, AC012630
8	AJ309472	AC008533, AC012630
9	AJ309473	AC008533, AC012630
10	AJ309474	AC008533, AC012630
11	AJ309475	AC008533, AC012630
12	AJ309476	AC012630, AC005348
13	AJ309477	AC012630, AC005348
14	AJ309478	AC005348
15	AJ309479	AC005348
16	AJ309480	AC005348
17	AJ309481	AC005348
18	AJ309482	AC004782
19	AJ309483	AC004782
20	AJ309484	AC004782
21	AJ309485	AC004782
22	AJ309486	AC004782
23	AJ309487	AC004782
24	AF508552	AC004782

Diese Klone verglich ich mit der cDNA Sequenz des *GRAF* Gens (Accessionnummer Y10388) von Bojesen und Borkhardt,²⁷ siehe A1, und erhielt dadurch die Intronsequenzen. Es wurde beim Primerdesign darauf geachtet, repetitive Sequenzen zu vermeiden, um mehrfache, unspezifische Bindung zu verhindern. Die Spezifität wurde zum einen durch die Verwendung langer Oligonukleotide bis zu 28mer mit Schmelzpunkten bis 86°C und die dadurch ermöglichte hohe Annealingtemperatur erhöht, zum anderen durch einen hohen G/C Gehalt der Oligonukleotide. Eine Liste der verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang unter A6.

Beispiel für die Position der Oligonukleotide:

Exon 3 (bp 256-317) (cd 84-104) AJ309467

```

cggggcctgg aagcctgcca gcctctcacc agtcctggat actctcagga acaggcagat
cttttccttg aagaaatcat tccctagcta gagtgccagg tggaattaac ctgcatttct
gggtcatcct taatggttaa tgattaaaaa gatgaaggga gccttgggaa gcaattgact
ttaggcacat gtatgtgcca aggaattaaa atccataaca taatagccag agctggaaag
gctccccaag gcccatgaca ctccttccac ctcatggccc ctttctgttt tccag
256
258 AGG TCT TTG CAG GAG TTT GCC ACT GTC CTC AGG AAT CTT GAA GAT GAA 100
306 CGG ATA CGG ATG 317 104

```

gtg

```

agtagggctg ggctactctt ggtcccagat agtatattcg tgttgagggg gcaagggatg
ggtatcagaa gaactagatt caaatccaga ctctgccatt tgaatgttt gagctcttca
gcaagcctca tctttgtaga gtttgaaggc ttttgtaaatt attaaaggat tactctggtg
gataacttta gaacaacgta gttaaatgat gtccttctga agattcattt taaggtcttt

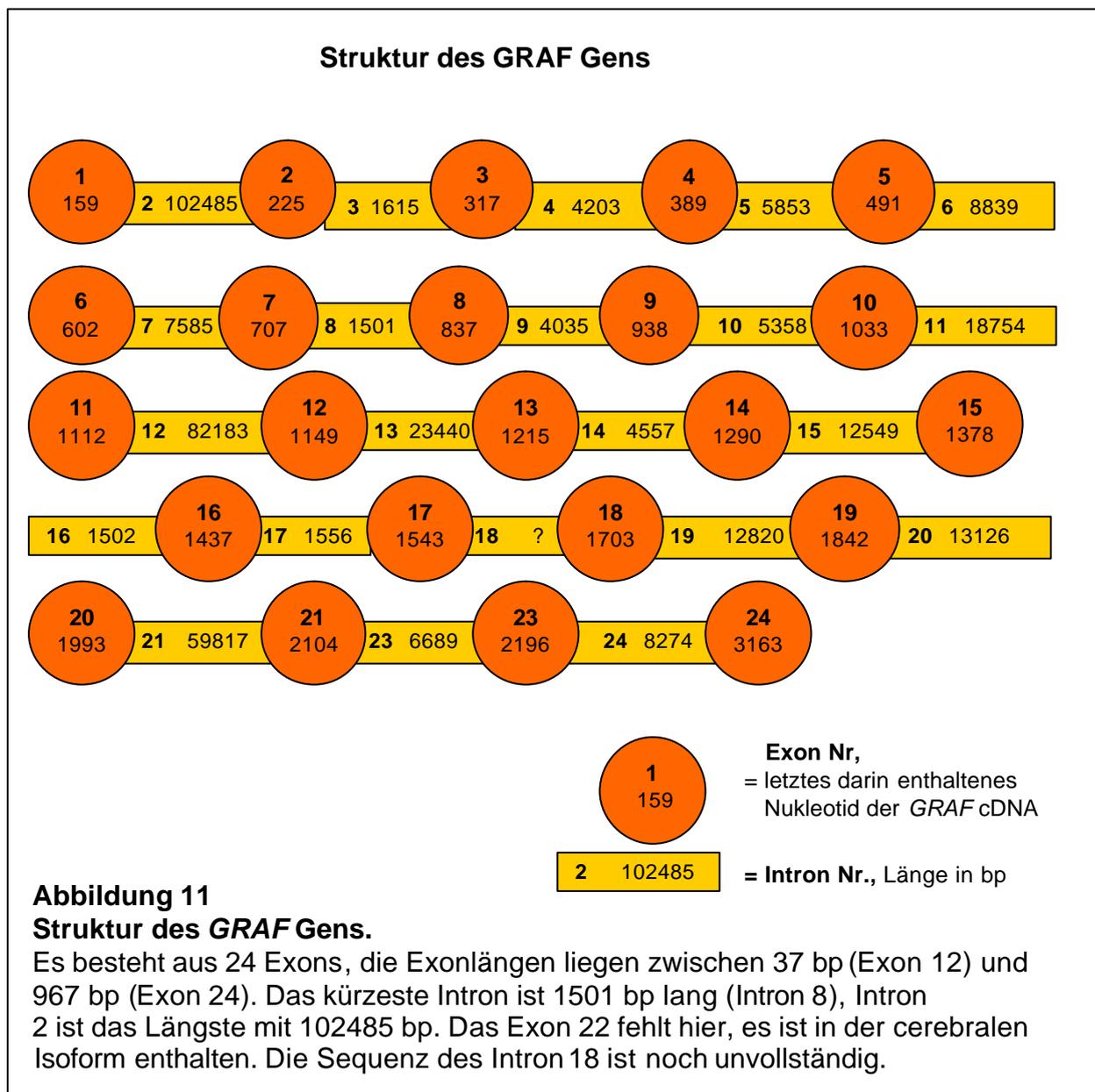
```

Abbildung 10
GRAF Exon 3
Kursiv gedruckt ist die Accession Nummer des Exons in Pubmed.
Fett gedruckt ist die Nummerierung der **Basenpaare** der cDNA des *GRAF* Gens,
in rot die **Codonnummern** des *GRAF* Gens, gelb unterlegt die **Primersequenzen**.
In Kleinbuchstaben: Intronsequenz, in Großbuchstaben: Exonsequenz.
Sämtliche Exons des *GRAF* Gens finden sich in dieser Form abgebildet im Anhang unter A4.

Die Verwendung von Nested PCRs war lediglich bei den ersten 7 Exons notwendig, alle anderen Fragmente konnten mit einem Lauf amplifiziert werden. Die Größe der Amplifikate wurde durch Agarose Gelelektrophorese im Vergleich mit einem

Längenstandard bestimmt und mit der postulierten Exonlänge verglichen. Siehe dazu auch Tabelle 10 im Anhang A3.

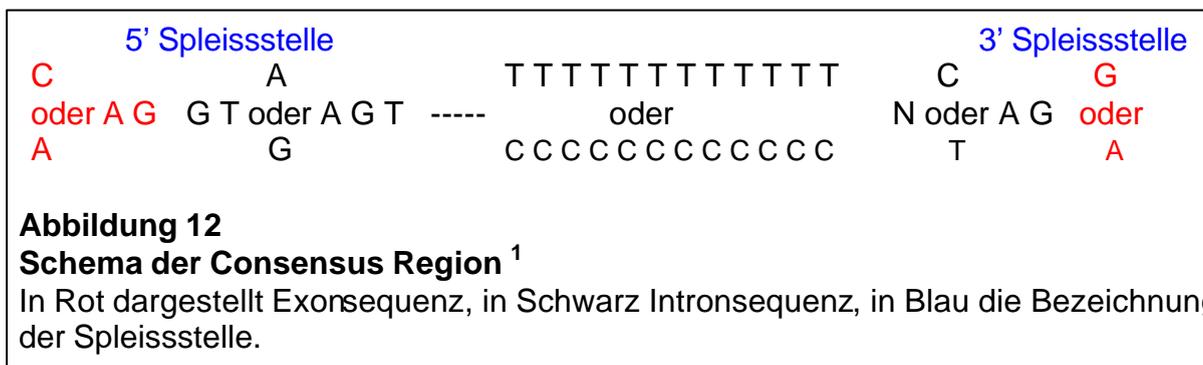
Mit dieser Vorgehensweise konnte gezeigt werden, dass das *GRAF* Gen aus 24 Exons besteht. Die Exonlängen liegen zwischen 37 bp (Exon 12) und 967 bp (Exon 24). Das kürzeste Intron ist 1501 bp lang (Intron 8). Intron 2 ist das längste mit 102485 bp. Das 5' Ende des Exon 1 sowie das 3' Ende des Exon 24 sind noch nicht vollständig ermittelt. Gesichert sind allerdings der Translationsstart und –stop des *GRAF* Gens. Der translatierte Bereich erstreckt sich bis zur Base 2284, das Stop Codon „TAA“ besteht aus den Basen 2285-2287. Die restlichen 876 bp gehören zur 3'-UTR. Die Isoform A des *GRAF* Protein besteht somit aus 759 AS. Die ermittelte AS Sequenz des *GRAF* Proteins ist im Anhang unter A2 abgebildet.



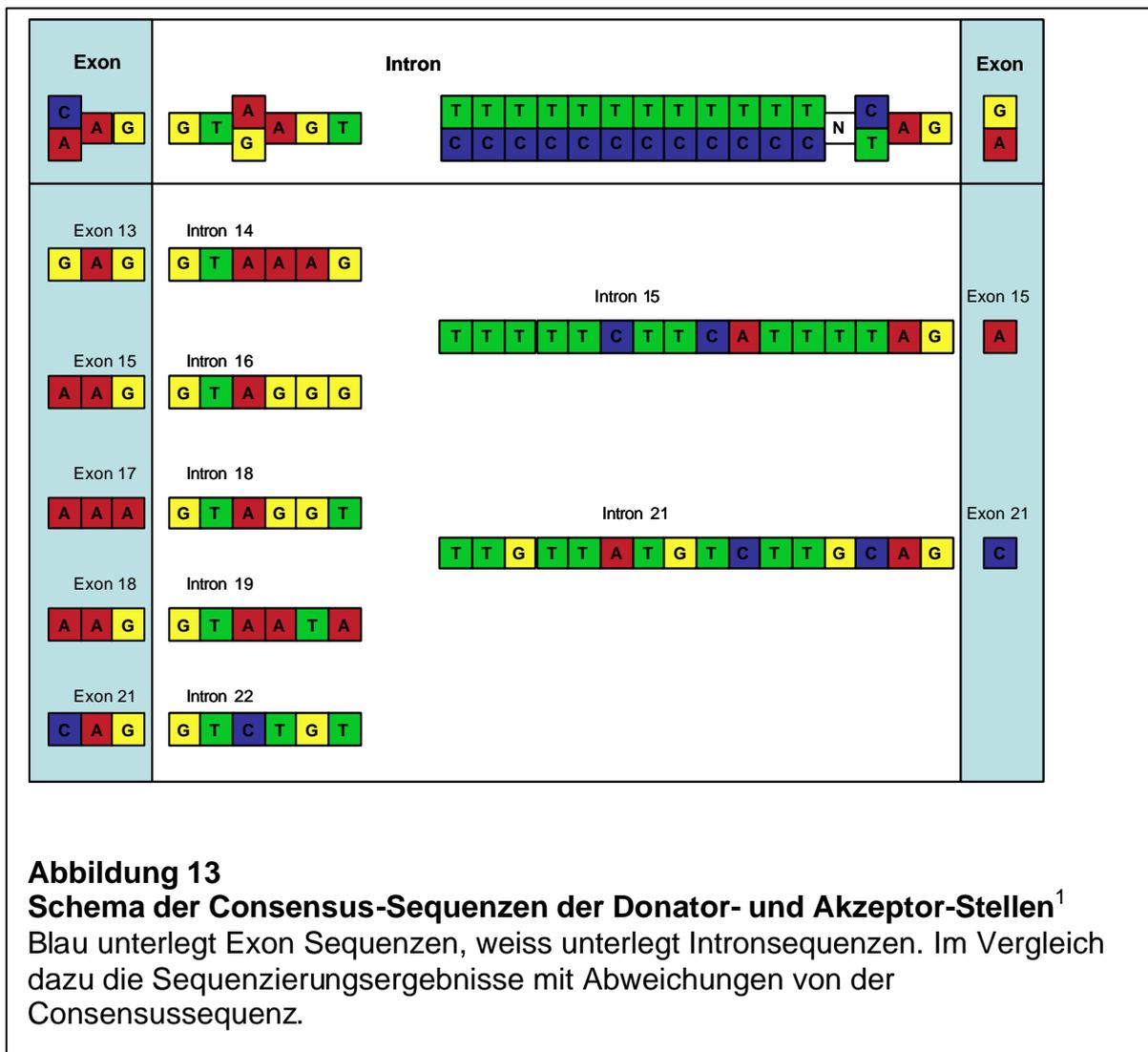
4.2 Sequenz der Exon-Intron Übergänge

Es wurde darüber hinaus untersucht, ob die Exon-Intron Übergänge die sogenannten Consensus Sequenzen enthalten. Unter einer Consensus Sequenz versteht man eine Häufung bestimmter Basen an den Exon-Intron-Grenzen. Mit einer Häufigkeit von fast 100% bestehen die letzten beiden Intron Basen aus A und G, die ersten beiden Basen im Exon sind fast immer G und T. Je weiter man sich in das Exon bzw. Intron hinein bewegt, desto geringer wird die Wahrscheinlichkeit, eine bestimmte Base in der jeweiligen Position vorzufinden.

Als Donatorstelle bezeichnet man die 5' Spleissstelle mit den Basen GT, mit denen ein Exon endet, unter einer Akzeptorstelle versteht man die 3' Spleissstelle mit den Basen AG am Ende eines Introns.⁵



Die Consensus-Sequenzen der Donator- und Akzeptor-Stellen konnte in 18 Exon – Intronübergängen des *GRAF* Wildtyps nachgewiesen werden, lediglich in den Introns 14, 15, 17, 18 und 21 weicht die *GRAF* Sequenz von der Consensus Sequenz ab. Die Abweichungen sind graphisch in der Abbildung 13 dargestellt.



Nach Exon 13 stehen im Intron 14 als 5. und 6. bp „AG“ statt „GT“. Im Intron 15 ist an 7. Stelle vor dem Exon 15 ein „A“ statt „C“ oder „T“ zu finden. Nach dem Exon 15 stehen die bp „GTAGGG“ statt „GT AoderG AGT“. Bei Intron 18 stimmt das 4. bp nach dem Exon 17 nicht mit der erwarteten Consensus Sequenz überein, ein „G“ steht an der Stelle des „A“. Im Intron 19 stehen an 5. und 6. Stelle nach Exon 18 „TA“ statt „GT“. In der Consensussequenz des Intron 21 stehen 11 und 9 bp vor Exon 21 „A“ und „G“ statt jeweils „T“ oder „C“ und der Anfang des Intron 22 beinhaltet nach „GT“ die Basen „CTG“ statt „AoderG AG“. Die genaue Sequenz aller Exon-Intron Übergänge ist ausführlich im Anhang unter A4 dargestellt.

4.3 Analyse der *GRAF* Sequenz in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie

Aus dem Material von 10 an AML oder MDS erkrankten Patienten synthetisierte ich die cDNA des *GRAF* Gens bis zum Stop Codon wie oben beschrieben. Durch eine PCR mit Primern, die am Anfang und Ende des *GRAF* Gens lagen, wurde die gesamte cDNA des *GRAF* Gens amplifiziert. Nach der Auftrennung der Fragmente im Agarose Gel zeigte sich, dass die Längen der Amplifikate zwischen ca. 2300 bp und < 500 bp variierten, während das STOP Codon in der Wildtyp cDNA bei 2282 bp liegt.

Zum Teil wurden mehrere Spleissvarianten desselben Patienten unterschiedlicher Länge amplifiziert. Die jeweiligen Patienten hatte dabei lediglich vom Wildtyp abweichende Spleissvarianten.



Abbildung 14
Agarose Gel der Amplifizierung von Patienten cDNA mit dem Plasmid Primer SP7. Man sieht das Vorkommen unterschiedlich langer cDNA Sequenzen bei den Patienten.

Nach der Klonierung von 14 unterschiedlich langen Sequenzen aus Patienten-DNA in den pCR II TOPO Plasmidvektor wurde aus der Patienten Plasmid DNA das *GRAF* Gen unter Verwendung der Plasmid Primern SP6 und T7 und 11 spezifischer Oligonukleotide sequenziert, die in der *GRAF* cDNA im Abstand von ca. 200 bp binden. Eine Liste der verwendeten Oligonukleotide mit ihrer Sequenz befindet sich im Anhang unter A6.

Es zeigte sich, dass 13 der 14 Klone Deletionen von 8 bp bis zu 1960 bp aufweisen. Die translatierten Bereiche erstrecken sich von 18 AS bis zu 303 AS.

Bei 7 der 14 Klone konnten in der cDNA Intronsequenzen des *GRAF* Gens nachgewiesen werden. Die genauen Sequenzierungsergebnisse sind aus Tabelle 7 ersichtlich, eine schematische Übersicht geben die Abbildungen 15 und 16. Die Aminosäuresequenzen der Patientenproben sind im Anhang unter A7 abgebildet.

Tabelle 7

Vergleich der Amplifikate von Patienten cDNA mit der cDNA des *GRAF* Gens.

Von drei Patienten (G,J, T,K und S,C) wurde mehrere Spleissvarianten untersucht.

Rot hervorgehoben sind Intronsequenzen des *GRAF* Gens aus Klon AC 004782, die in der Patienten cDNA gefunden wurden.

Grün dargestellte sind Sequenzen, die dem Exon 22 des *GRAF* Gens im zerebralen Transkript (AJ 309486) entsprechen.

Patient	Klon Nr.	Amplifikat Länge	<i>GRAF</i> cDNA Sequenz, die in der Patienten cDNA gefunden wurde
H,D	1	2287 bp	6 -2287
B,J	2	1473 bp	6 -1055; 2005-2196; AC 004782: 86908-86756 ; 2193-2287
G,J	3	1419 bp	6 -647;1514-2287
„	6	1025 bp	6 -778; 2040-2287
„	11	667 bp	6 -223; 1837-2287
S,E	4	1346 bp	6 -516; 1920-2104; AJ 309486: 284-448 , AC 004782: 92632-92482 , 2105-2196, AC 004782: 86908-86752 , 2193-2287
T,K	5	1214 bp	6 -163; 1117-1993; 2105-2287
„	10	684 bp	3 -34; AC 004782: 128195-128143 ; 1994-2197; AC 004782: 84674-84985 , 83311- 83473, 83148-83273; 2196-2287
S,C	7	876 bp	6 -33; AC 004782: 771 bp in vielen Fragmenten ; 2195-2287
„	13	370 bp	6 -33; AC 004782: 247 bp in vielen Fragmenten ; 2196-2287
J,F	8	762 bp	6 -159; 1844-2105; AJ 309486: 284-448 ; 2101-2287
F,J	9	757 bp	6 -33, AC 004782: 639 bp in vielen Fragmenten ; 2197-2287
G,J	12	546 bp	6 -48; 1787-2287
N,A	14	317 bp	6 -53; 2017-2287

Vergleich der cDNA von *GRAF* Wildtyp und Patienten

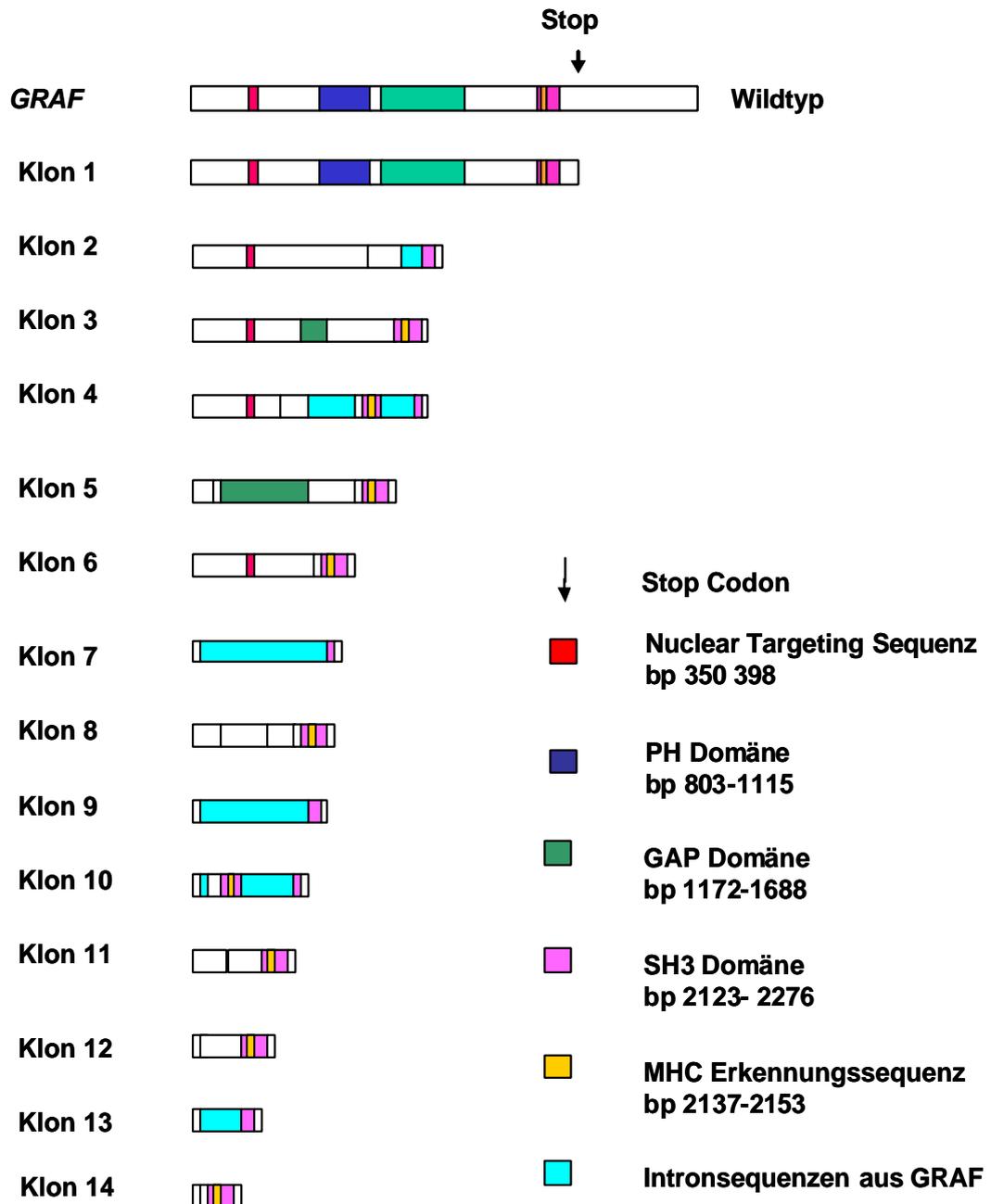
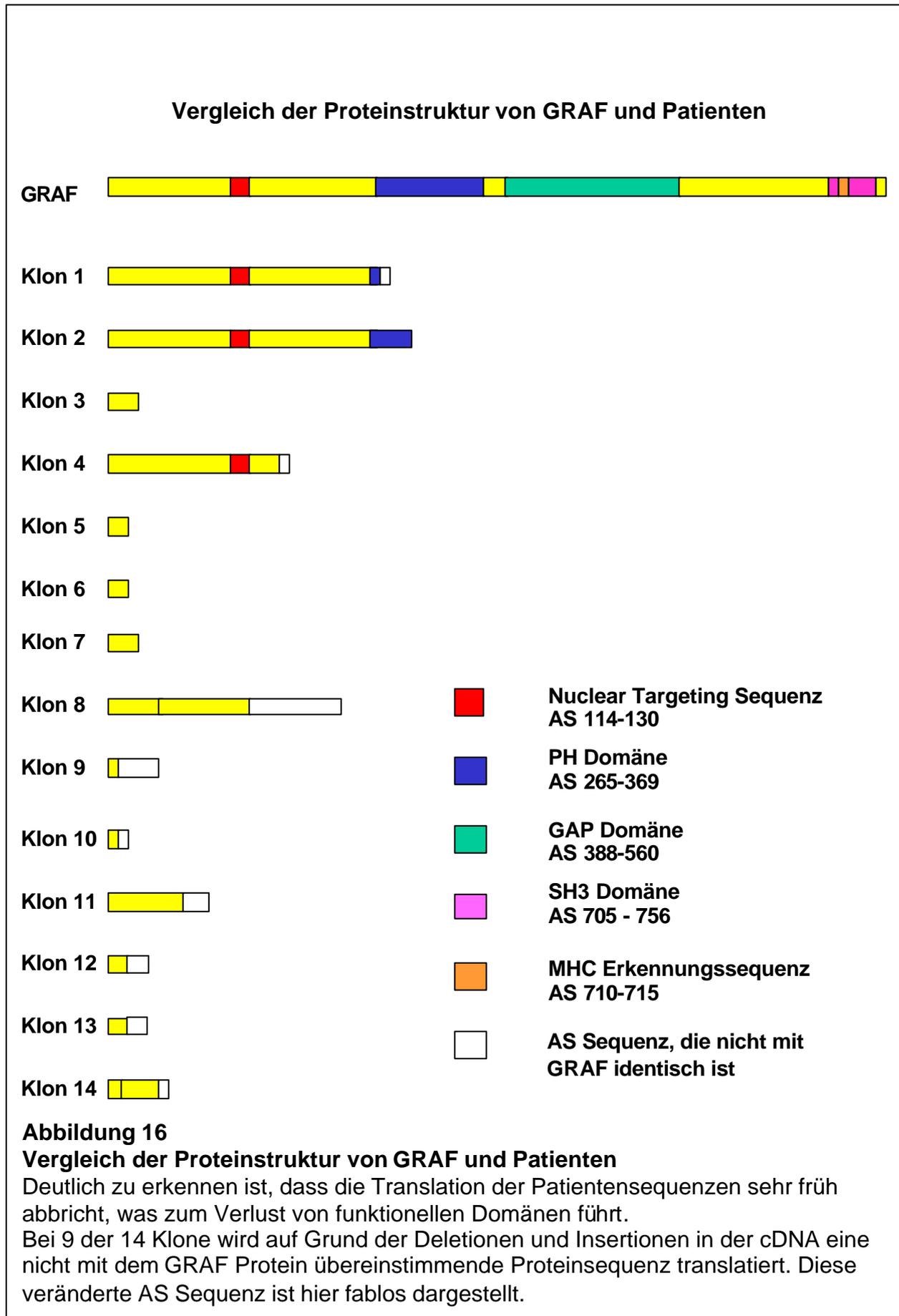


Abbildung 15

Vergleich der cDNA Struktur des *GRAF* Wildtyps mit der cDNA der Patienten.

Die einzelnen Domänen sind entsprechend der Legende farblich markiert. Wie deutlich zu sehen ist, sind in 13 der 14 Klone Deletionen zu verzeichnen, in 7 Klonen konnte Intronsequenz in der cDNA nachgewiesen werden. Diese Intronsequenzen sind türkis gekennzeichnet.

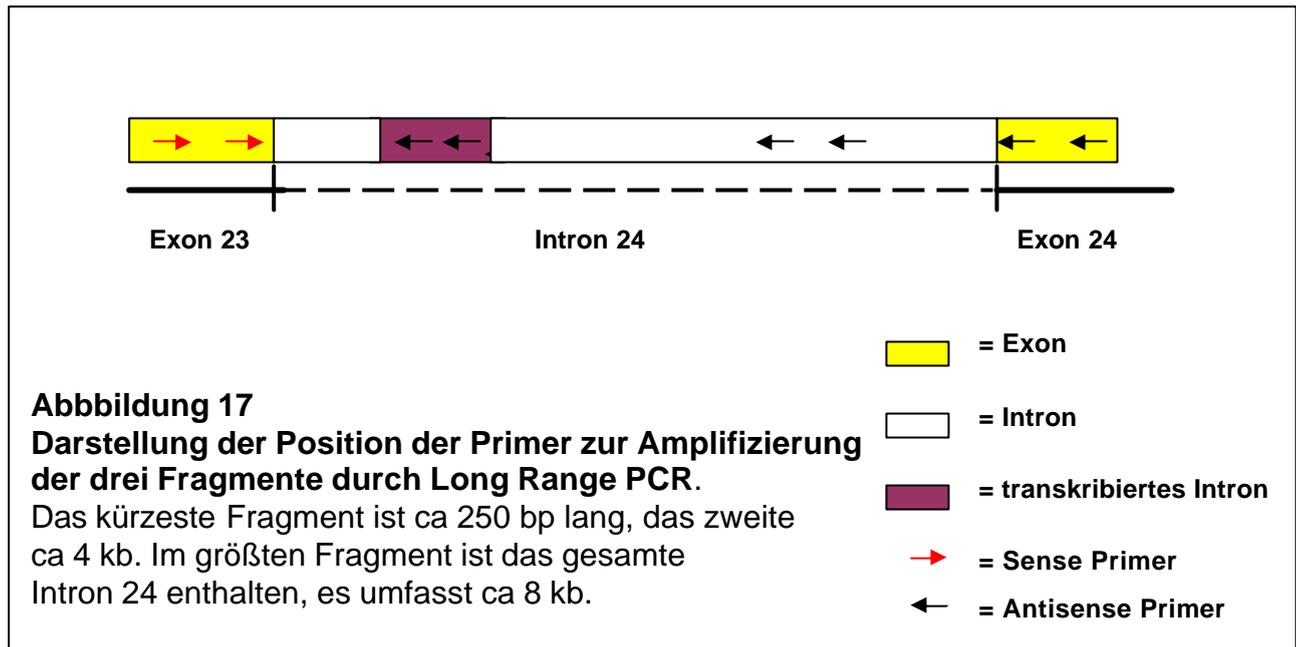


4.4 Sequenzierung der genomischen DNA eines Klones, der Intronsequenz in der cDNA enthält

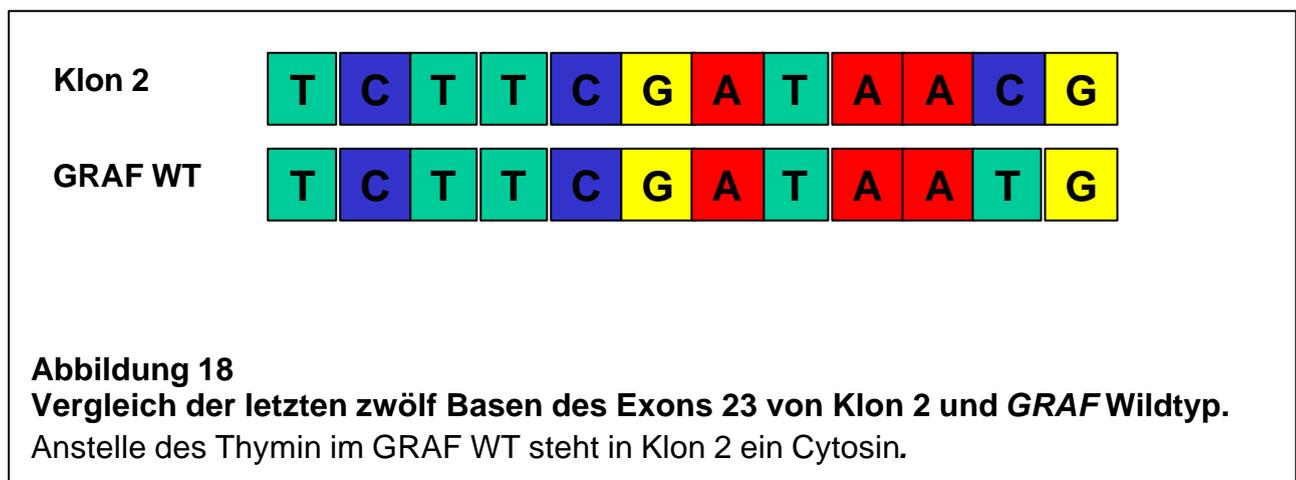
Bei insgesamt 7 der 14 sequenzierten Klone konnte Intronsequenz in der cDNA nachgewiesen werden. Durch Sequenzieren von Teilen der genomischen DNA eines dieser Klone sollte die Ursache der Retention von Intronsequenzen in der cDNA untersucht werden.

Im Klon 2 sind die Basen 6-1055 des *GRAF* Gens enthalten, nach Deletion der Basen 1056 bis 2004 schliessen sich an das Nukleotid 1055 die *GRAF* Basen 2005 bis einschliesslich 2196 an. Dies entspricht dem Ende des Exon 23. Die folgenden 152 bp entstammen inserierter Intronsequenz des Intron 24 des *GRAF* Gens. Nach dieser eingeschobenen Sequenz stimmen die Nukleotide von Klon 2 wieder mit dem Wildtyp überein.

Durch Long Range Nested PCR wurden drei unterschiedlich lange Fragmente amplifiziert. Als Sense Primer dienten jeweils die gleichen Primer, die beide im Exon 23 des *GRAF* Gens binden. Dabei handelt es sich um das Exon direkt vor der transkribierten Intronsequenz. Zur Amplifizierung des kürzesten Fragmentes von ca. 250 bp legte ich die Antisense Primer 236 bp und 291 bp upstream des Endes von Exon 23 in den Anfang des transkribierten Intronfragmentes, die nächsten downstream Primer für das Fragment mittlerer Länge binden in der Mitte des Intron 24, 4252 bp und 4294 bp upstream des Exon 23, und das längste Fragment von ca. 8 kb erhielt ich durch Positionierung der Antisense Oligonukleotide im Exon 24, so dass hiermit das gesamte Intron 24 amplifiziert werden konnte. Bei der Gestaltung der Primer wurde darauf geachtet, dass sie eine Länge von mindestens 33 Basen aufwiesen, um eine möglichst spezifische Bindung zu gewährleisten. Die folgende Abbildung zeigt die Lage der Primerpaare in der genomischen DNA des Klon 2. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang unter A6 zu finden.



Die erhaltene Sequenz der genomischen DNA unterschied sich lediglich in der vorletzten Base des Exon 23 von der Sequenz des *GRAF* Wildtyp Klonen AC004782, C wurde durch T ersetzt. Jedoch ergaben Sequenzierungen von genomischer DNA 10 gesunder Blutspender dieselbe Veränderung, so dass es sich hierbei nicht um eine Mutation des Patientenklons sondern am ehesten um einen Polymorphismus handelt.



2196. Danach sind 157 bp *GRAF* Intronsequenz aus dem Intron 24 (AC 004782, Basen 86908 bis 86752) eingeschoben. Die letzten 95 bp der Patientensequenz entsprechen den *GRAF* cDNA Basen 2193 bis 2287. Insgesamt ist die Sequenz 1346 bp lang, wovon 512 bp auf Intronsequenz zurückzuführen sind.

Es liegt eine Deletion der GAP Domäne vor, die SH3 Domäne ist durch Intronsequenz geteilt. Translatiert werden 180 AS, wobei die AS 1-170 identisch mit dem *GRAF* Protein sind. Diese AS Sequenz entspricht den Basen 6-516 und enthält N-Glykosylierungs Stellen, cAMP und cGMP abhängige Protein Kinase Phosphorylierungs Stellen, Casein Kinase II Phosphorylierungs Stellen, Tyrosinkinase Phosphorylierungs Stellen und die Nuclear Targeting Sequenz. Durch die Deletion von 1403 bp werden die darauf folgenden *GRAF* cDNA Basen in verschobenem ORF translatiert, so dass diese AS Sequenz nicht mit der *GRAF* Sequenz übereinstimmt. Nach 10 Codons folgt das Stop Codon "TGA".

4.5.2 Klon 8 und sein Genprodukt

Die Sequenz des Klon 8 ist 762 bp lang. Die Basen 6-159 sind identisch mit der cDNA des *GRAF* WT. Die *GRAF* Basen 160 bis 1843 fehlen, so dass sich in der Patientensequenz an die Base 159 die *GRAF* Base 1844 anschliesst. Bis Base 2105 stimmen die beiden Sequenzen wieder überein, darauf folgen 162 Basen des *GRAF* Exons 22 (Accessionnummer AJ 309486, Basen 284-448). Danach findet man die Basen 2101 bis zum Stop Codon des *GRAF* Gens. Bei dieser *GRAF* Mutante fehlen die Nuclear Targeting Sequence sowie die GAP Domäne. Insgesamt werden 211 AS translatiert. Die ersten 136 AS entsprechen den *GRAF* AS 1-51 und 614 – 697, die sich daran anschliessenden 75 AS stimmen nicht mit dem *GRAF* Protein überein. Durch die beschriebenen Veränderungen entsprechen lediglich zwei Protein Kinase C Phosphorylierungs Stellen sowie die Prolin reiche Region dem *GRAF* Protein. Die Prolin reiche Region liegt im *GRAF* Protein bei den AS 657-688.

4.5.3 Klon 11 und sein Genprodukt

Die Probe des Klons 11 ist 667 bp lang. Darin sind die ersten 223 bp der *GRAF* cDNA Sequenz enthalten, die Basen 224 bis 1836 sind deletiert, so dass sich im Klon 11 an die Base 1837 die *GRAF* Base 223 anschliesst. Die restlichen 450 bp stimmen mit den *GRAF* Basen bis zum Stop Codon überein. Die ersten 74 AS sind bei Klon 11 und *GRAF* WT identisch, doch durch die Deletion der 1612 Basen wird der ORF verschoben, so dass die folgenden AS nicht übereinstimmen. Auf die AS 97 folgt in der Patientensequenz das Stop Codon "TAA".

In den ersten 74 identischen AS sind eine N Glykolysierungs Stelle , mehrere Protein Kinase C Phosphorylierungs Stellen und eine Casein Kinase II Phosphorylierungs Stelle enthalten. Die nicht mit GRAF übereinstimmenden AS ist auf ein ATP/GTP Bindungsmotiv zurückzuführen.

4.5.4 Genprodukt der GRAF Mutanten

Beim Bearbeiten der AS Sequenz mit Hilfe des Programmes Prosite konnten in der AS Sequenz des Klons 4 keine Domänen nachgewiesen werden, die nicht auch in GRAF enthalten sind. Wir konnten neben den häufig auftretenden Domänen N Glykolysierungsstelle, cAMP und cGMP abhängige Protein Kinase

Phosphorylierungsstelle und verschiedener Casein Kinase II

Phosphorylierungsstellen auch die GRAF Domänen für die Phosphorylierung der Tyrosin Kinase sowie die Nuclear Targeting Sequenz⁶⁵ nachweisen. Es fehlen allerdings die GAP Domäne, SH3 Domäne und MHC Erkennungssequenz.

Klon 8 beinhaltet die GRAF N-Glykosylierungs Stelle, Protein C Kinase Phosphorylierungsstelle, Casein Kinase II Phosphorylierungsstelle, die N-Myristoylierungsstelle und die Serin und Prolin reiche Regionen. In den Sequenzen sind allerdings einzelne AS verändert. Durch die Deletion und das Stop Codon fehlen neben der Nuclear Targeting Sequenz die GAP Domäne, SH3 Domäne und MHC Erkennungssequenz.

Der Klon 11 besteht vor der translatierten Intronsequenz aus den Stellen für N-Glykosylierung, Protein Kinase C Phosphorylierung und Casein II Kinase Phosphorylierung zusätzlich aus einer Stelle, die nicht im GRAF Wildtyp enthalten ist. Dabei handelt es sich um ein ATP/ GTP Bindungsstellen Motiv in den AS 38 bis 45. Eine ATP oder GTP spaltende Wirkung scheinen diese Motive nicht zu haben. Durch die Deletion und Insertion des translatierten Introns kommt es auch in diesem Klon zu einem verfrühten Abbruch der Transkription. Die Domänen Nuclear Targeting Sequenz, GAP, SH3 und MHC Erkennungssequenz des GRAF Wildtyps fehlen auch hier.

Somit lässt sich sagen, dass in den Klonen 4 und 8 ausschliesslich GRAF Wildtyp Domänen enthalten sind, das GRAF Protein bei beiden jedoch unvollständig ist. Auch im Klon 11 fehlen mehrere GRAF Domänen, zusätzlich dazu ist hier jedoch eine GRAF fremde Domäne enthalten.

Eine Interaktion der beschriebenen Proteine mit den GRAF Mutanten zeigt sich beim Züchten der Co-Transformanten auf Induktionsplatten.

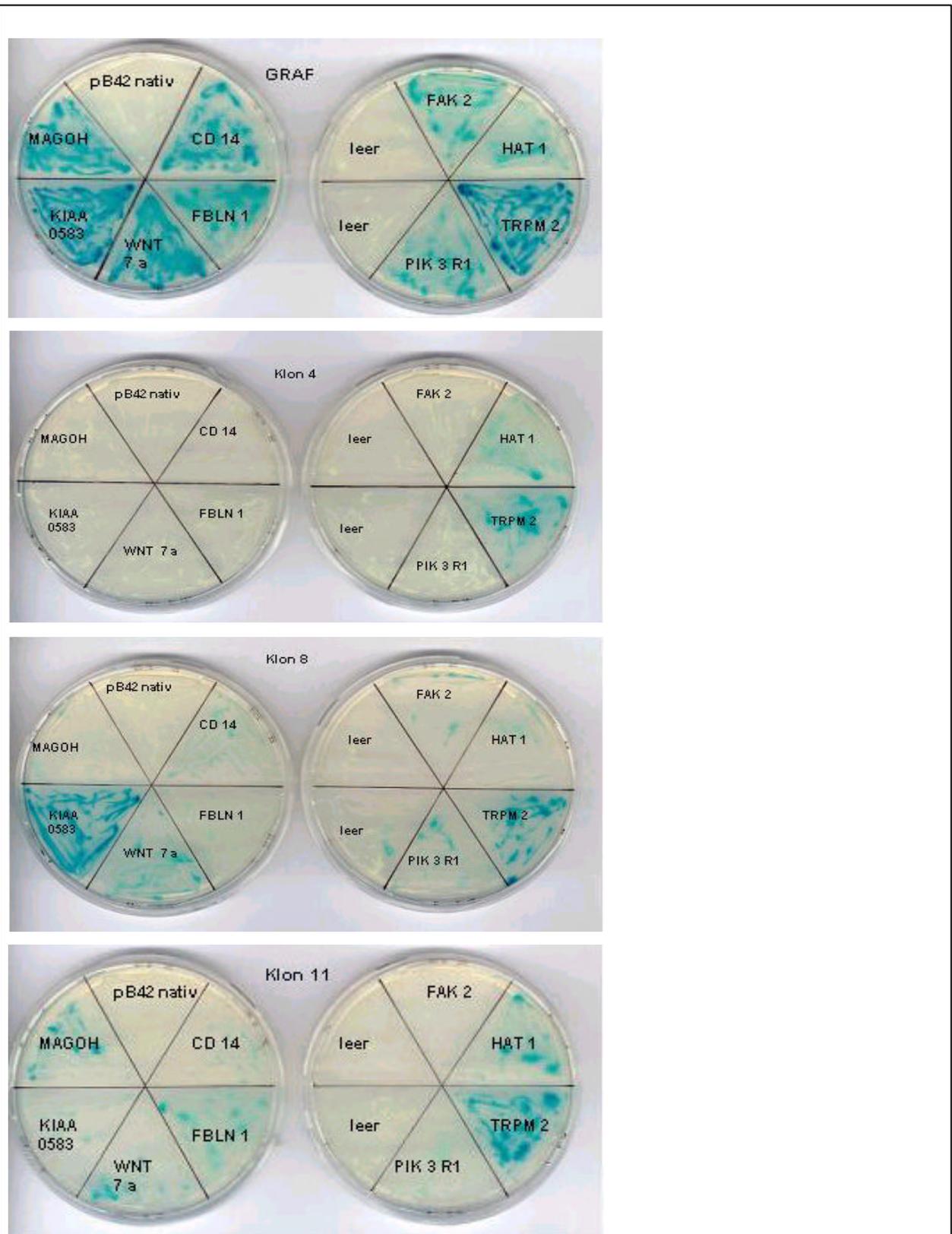


Abbildung 20

Ergebnis des Yeast Two Hybrid Versuchs: Induktionsplatten (SD/ Gal/ Raf/-His/-Leu/-Trp/-Ura) zeigen die Interaktionen zwischen GRAF bzw. GRAF Mutante und den potentiellen Interaktionspartnern CD 14, FBLN 1, WNT 7 a, MAGOH, KIAA 0583, FAK 2, HAT 1, TRPM 2, PIK3 R 1.

Interagieren die Köder- und Beutekonstrukte, wird das Reportergen LacZ translatiert und X-gal, das Laktoseanalogon, kann zu einem dunkelblauen Reaktionsprodukt abgebaut werden.

Im folgenden werden die Ergebnisse des Two Hybrid Versuchs tabellarisch dargestellt:

Tabelle 8

Ergebnis der Protein-Protein-Interaktionen des Yeast Two Hybrid Assays.

In der ersten Zeile sind die Köderkonstrukte aufgeführt, in der ersten Spalte die Beutekonstrukte. Der Grad der Anfärbung auf den Induktionsplatten wird von keiner (-) bis deutlicher Blaufärbung (+++) differenziert angegeben.

	pLexA- GRAF Wildtyp	pLexA-GRAF-P4	pLexA-GRAF-P8	pLexA-GRAF-P11
pB42-AD nativ	(-)	(-)	(-)	(-)
CD 14	(+++)	(-)	(+)	(+)
FBLN 1	(+++)	(-)	(-)	(+)
WNT 7 a	(+++)	(-)	(+)	(+)
KIAA 0583	(+++)	(-)	(+++)	(+)
MAGOH	(+++)	(-)	(+)	(+)
FAK 2	(+++)	(-)	(+)	(-)
HAT 1	(+++)	(+)	(++)	(++)
TRPM 2	(+++)	(++)	(+)	(+++)
PIK 3R1	(+++)	(-)	(+)	(-)

5 Diskussion

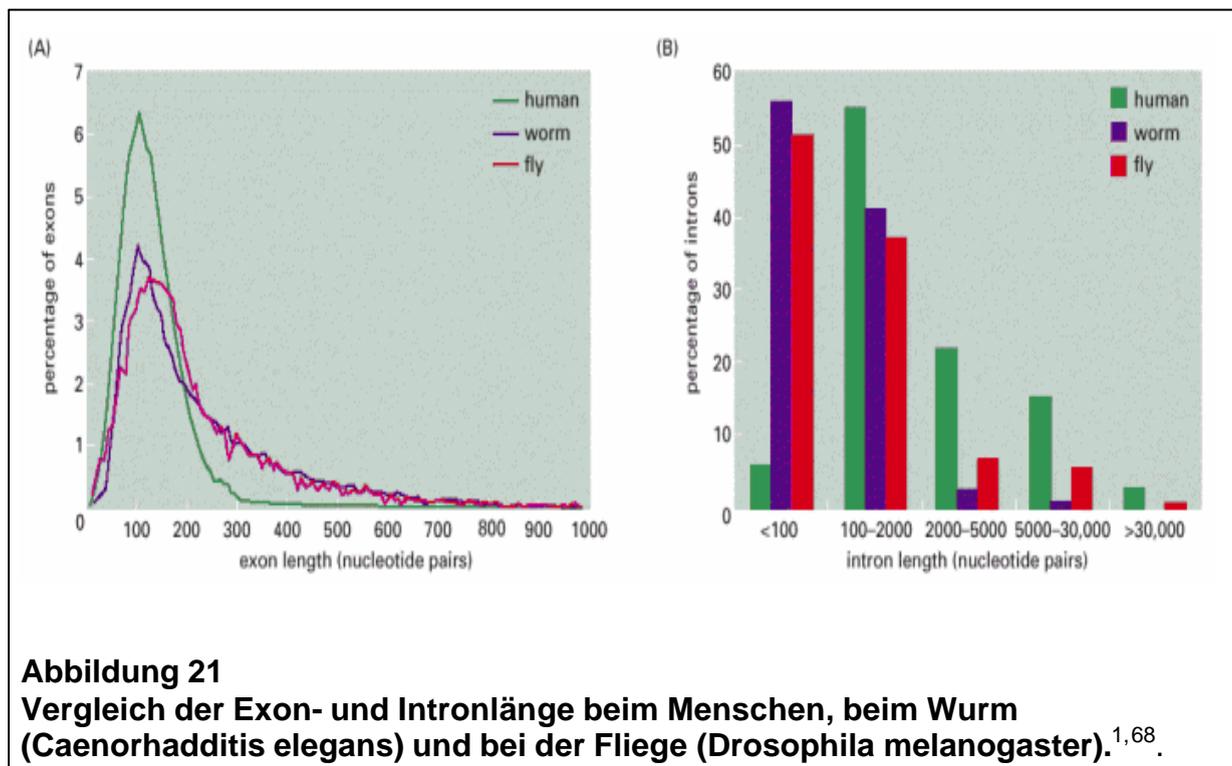
5.1 Struktur des *GRAF* Gens

Das *GRAF* Gen besteht wie zuvor beschrieben aus 24 Exons, die *GRAF* cDNA enthält 3163 bp, die genomische DNA enthält ca. 4000 kb. Damit handelt es sich beim *GRAF* Gen um ein relativ großes Gen, wie der Vergleich mit der Serin/Threonin Kinase *hcstk* und dem humanen *ALL-1/MLL/HRX* Gen zeigt.

Tabelle 9

Vergleich der Größe und Zahl der Exons der Gene *GRAF*, *hcst* und *ALL-1/MLL/HRX*.

	<i>GRAF</i> Gen	<i>hcstk</i> Gen ⁶⁶	<i>ALL-1/MLL/HRX</i> Gen ⁶⁷
Genomische Größe	4000 kb	26,7 kb	92 kb
Zahl der Exons	24	26	37



Die Angabe der genomischen Größe ist nur ein Schätzwert, da die genaue Länge des Intron 18 noch nicht bekannt ist. Die Exonlängen variieren zwischen 37 bp (Exon 12) und 967 bp (Exon 24). Das kürzeste Intron ist 1501 bp lang (Intron 8), das größte umfasst 102 485 bp. An das Stop Codon schliesst sich eine 876 bp

umfassende UTR an. Bisher nicht genau bekannt ist das 5' Ende des Exon 1 sowie das 3' Ende des Exon 24.

Der Aufbau des *GRAF* Gens entspricht in Anbetracht der Anzahl und Größe der Exons und Introns dem typischen Aufbau eines eukaryonten Gens.

Eine Besonderheit des *GRAF* Gens ist die Isoform B des zerebralen Transkriptes, die das Exon 22 enthält, das im Wildtyp der in dieser Arbeit untersuchten Isoform A jedoch nicht enthalten ist.

In zwei der sequenzierten Klone, Klon 4 und 8, von Patienten, die beide an AML erkrankt sind, war das Exon 22 auch in der cDNA enthalten. Aufgrund von Verschiebungen im Leserahmen wurde diese Sequenz jedoch nicht im ORF des Exons translatiert. Somit entstand ein vom Wildtyp abweichendes Protein.

5.2 Insertion von *GRAF* Intronsequenz in cDNA

Aus der prä-mRNA, dem Transkript der DNA, werden im Reifungsprozess zur mRNA die Introns herausgeschnitten und die verbleibenden Exons zusammengefügt. Die Exons werden dann zu Proteinen, dem Genprodukt, translatiert. Durch Variationen des sogenannten Spleissens, das heisst durch unterschiedliche Kombination der Exons, erhält man von ein und demselben Gen verschiedene Proteine. Man nennt diesen Mechanismus alternatives Spleissen.^{69,70,71} Durch das alternative Spleissen lässt sich die Diskrepanz zwischen relativ geringer Genzahl und hoher Komplexität vieler Organismen erklären. Alternative Spleissformen spielen sowohl bei der Entwicklung von Organismen als auch bei der Entstehung von Tumoren eine Rolle.

Aus dem Primärtranskript der genomischen DNA schneiden Spleisskomplexe, die sogenannten snRNPs,¹ die Introns heraus, so dass die nach dem Spleissen miteinander verbundenen Exons die mRNA bilden und den Zellkern verlassen können.

Die snRNPs erkennen die Exon-Intron Grenzen anhand typischer Basenabfolgen, die die Exon-Intron Übergänge charakterisieren. Diese Basenabfolgen nennt man wie bereits im Ergebnisteil beschrieben Consensusregion. Zusätzlich zu der Consensusregion ist eine weitere Nucleotidsequenz von vier Basen für das Erkennen der Exon-Intron Grenze entscheidend, die ca. 30 bp downstream des Übergangs von Intron - in Exonsequenz liegt. Sie ist der Verzweigungspunkt der bei der Spleissreaktion gebildeten Schlinge aus Intronsequenz. Die ausgeschnittene

Intronsequenz wird als Lariat freigesetzt und die beiden freien Exonenden werden verbunden, so dass die mRNA entsteht.¹

Bei 36 der 43 bisher bekannten Exon-Intron Übergänge im *GRAF* Gen stimmt die *GRAF* Sequenz mit der Consensussequenz überein. Die Abweichungen im Bereich der 3' Enden der Exons 13 und 17 und der Introns 15 und 21 sowie die 5' Enden der Introns 14,16,18,19 und 22 können ein fehlerhaftes Spleissen⁷² nach sich ziehen.

Die in dieser Arbeit in der *GRAF* cDNA der Patienten gefundene n Intronsequenzen stammen alle aus den *GRAF* Introns 21, 23 und 24. Jedoch konnte ausser bei Intron 21 in den betreffenden Sequenzen keine Veränderung in der Consensusregion nachgewiesen werden.

Um eine Erklärung für das Vorkommen von Intronsequenz in der cDNA der Patienten zu finden, wurde mittels Long Range PCR aus der genomischen DNA des Klon 2 der Übergang von Exon 23 über das inserierte Intron 24 hinaus bis ins daran anschließende Exon 24 amplifiziert.

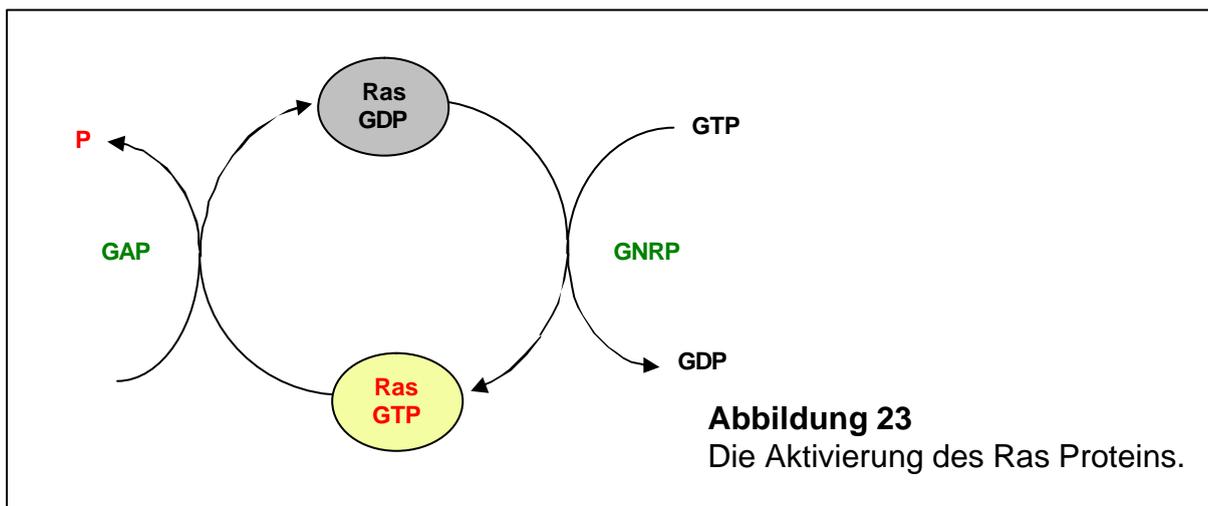
Bei der Sequenzierung des so gewonnenen PCR Produkts konnte an der die Insertion enthaltenden Stelle jedoch kein Unterschied zwischen dem *GRAF* Wildtyp und der Patienten DNA gefunden werden. Demnach kann das Vorkommen von Intronsequenzen in der cDNA nicht auf eine Mutation auf genomischer Basis in diesem Bereich zurückgeführt werden.

Der genaue Vorgang des Spleissens ist noch nicht bekannt. Man weiss, dass auf genomischer Ebene einzelne Exons durch Bindung an Proteine markiert werden.⁷³ Die markierten Exons werden beim Spleissprozess nicht entfernt, sondern gelangen über die mRNA ins Cytoplasma und werden dort tranlatiert. Eine Erklärung für das Vorhandensein von Intronsequenz in der cDNA könnte bei einem fehlerhaften Markieren im Spleissprozess liegen oder bei Veränderung in den regulatorischen Sequenzen weiter up- oder downstream der betreffenden Stelle.

Signalübertragung für Wachstum und Differenzierung der Zellen.⁷⁵ Tritt eine Mutation in den Ras Genen auf, führt dies zum Verlust der Kontrolle über Zellwachstum und –differenzierung, also zu einem Tumor.⁷⁶ Man geht davon aus, dass etwa 30 % der menschlichen Tumore auf Mutationen in Ras Genen zurückzuführen sind.¹

Ras Proteine sind in GTP gebundener Form aktiv. Die Dephosphorylierung zu GDP bewirkt eine Konformationsänderung der GTP-Bindungsdomäne und inaktiviert das Protein.

Die Regulation von Ras erfolgt zum einen durch den Austausch von GDP zu GTP durch GNRPs.¹ Zum anderen erfolgt die Regulierung durch eine Steigerung der Hydrolysegeschwindigkeit und damit einer Inaktivierung durch GAP. GAP steht für „GTPase aktivierendes Protein“. Es kontrolliert die Aktivität von Ras und anderen GTP-bindenden Proteinen und wirkt auf sie solange inaktivierend bis sich GNRP an das Ras-GDP bindet, GDP abgegeben wird und die freie Bindungsstelle sofort von GTP besetzt wird.



Das Protein Ras bindet und aktiviert Raf, eine Serin/Threonin Kinase. Über die Aktivierung mehrerer Kinasen führt dies zur DNA Synthese. Exzessive Raf Aktivität schaltet den Zellzyklusinhibitor p21 Waf1/Cip1 ein, so dass eine übermäßige DNA Synthese gestoppt wird.

Olson et al.⁷⁷ haben nachgewiesen, dass Rho den Inhibitor p21 Waf1/Cip1 supprimiert, so dass Ras die Zellen in die S-Phase, die Phase der DNA Replikation des Zellzyklus, bringen kann und somit DNA synthetisiert wird.

GRAF interagiert sowohl in vivo als auch in vitro mit FAK und Rho A²⁷ und inaktiviert Rho in seiner Funktion als GTPase. Die Wirkung des Zellzyklusinhibitors wird also

unter der Einwirkung von GRAF nicht supprimiert, es kommt damit zur Verminderung der DNA Synthese durch GRAF.

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Patientenklone war hingegen in keinem eine GAP Domäne enthalten, so dass man die These aufstellen kann, dass bei diesen Patienten Rho aktiviert bleibt. Dies würde dazu führen, dass die Wirkung des Zellzyklusinhibitors p21Waf1/Cip1 supprimiert bleibt. Als Folge davon wäre die DNA Synthese weniger stark inhibiert und somit könnte die Entstehung eines Tumors erklärt werden.

Als weitere wichtige Domäne folgt die SH3 Domäne.⁷⁸ Sie besteht aus ca. 60 Aminosäuren. Im GRAF Protein sind dies die Aminosäuren 701 bis 759. Sie vermittelt Protein-Protein-Interaktionen^{79,80} und bindet an Prolin reiche Peptide. Ein Teil der SH3 Domäne konnte im Klon 14 nachgewiesen werden. Bei allen anderen Patientenklonen fehlt die SH3-Domäne aufgrund der Veränderung der cDNA. Der Verlust dieser Domäne könnte zu einer verminderten Protein-Protein Interaktionsfähigkeit der Klone führen. Dies würde die ausbleibenden Interaktionen der die GRAF Mutanten enthaltenden Beutekonstrukte im Yeast Two Hybrid Versuch erklären.

Die letzte Domäne des *GRAF* Gens ist die MHC Protein Erkennungssequenz.⁸¹ Im Wildtyp setzt sie sich aus den AS 710 bis 716 zusammen, liegt also in der SH3 Region. Diese Sequenz ermöglicht den Zellen, körpereigenes von körperfremdem Material zu unterscheiden. Das Erkennungsmerkmal sind die MHC Moleküle, die sich aus einem extrazellulären, einem transmembranösen und einem zytoplasmatischen Teil zusammensetzen und Bestandteil jeder Zelle sind. In keinem der Patientenklone konnte jedoch die MHC Erkennungssequenz nachgewiesen werden.

5.4 Tumorentstehung durch Veränderung im *GRAF* Gen und seinem Genprodukt

In der vorliegenden Arbeit wurden Proben von Kindern, die an AML erkrankt sind, auf Veränderungen im *GRAF* Gen untersucht und mit dem Wildtyp Gen verglichen. Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, werden in den Patientensequenzen nur Bruchstücke des *GRAF* Gens translatiert, in 11 der 14 Klone ist keine der wichtigen GRAF Domänen enthalten, so dass in diesen Klonen ein Funktionsverlust des GRAF Proteins vorliegt. Somit kann, wie zuvor beschrieben, GRAF Rho A nicht mehr

inhibieren, so dass möglicherweise über die ungebremste Supprimierung des Zellzyklusinhibitors p21 Waf1/ Cip1 die DNA Synthese unkontrolliert gesteigert wird und es damit zur Tumorentstehung kommt.

Bei den hier untersuchten Patientenproben wurde zytogenetisch jeweils der Verlust eines Allels im Bereich 5q31 nachgewiesen. Eine Veränderung im zweiten Allell könnte gemäss der Two Mutation Hypothese von Knudson⁸² zur Entstehung eines Tumors führen.

Alle in dieser Arbeit sequenzierten Patientenproben weisen Veränderungen der cDNA auf, die dazu führen, dass die translatierten Proteine in ihrer Funktion nicht dem GRAF Wildtyp Protein entsprechen.

Da in diesem Teil der Arbeit ausschliesslich mit der cDNA der Patientenklone gearbeitet wurde, gelten die erlangten und beschriebenen Ergebnisse jeweils nur für die sequenzierte Spleissvariante. Von 3 Patienten wurden mehrere cDNA Klone untersucht. So stammen jeweils Klon 3, 6 und 11, Klon 5 und 10, sowie Klon 7 und 13 von demselben Patienten. Neben dem Vorkommen von verschiedenen hier nicht untersuchten Spleissvarianten sind auch Klonierungsfehler nicht mit Sicherheit auszuschliessen.

Somit ist eine Aussage zur Funktion des *GRAF* Gens lediglich für die hier untersuchten Spleissvarianten möglich. Zur Klärung der Frage, ob *GRAF* ein Tumorsuppressorgen ist, bedarf es damit weiterer Funktionsuntersuchungen dieses Gens.

5.5 Protein Interaktionen

Aufgrund der vom GRAF Wildtyp abweichenden Proteinstruktur der drei Klone aus Patientenproben war von einer vom GRAF Wildtyp abweichenden Proteinfunktion auszugehen, was im Yeast Two Hybrid Versuch gezeigt werden konnte.

Von manchen Proteinen ist die Domäne bekannt, die an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist, wie z.B. bei FAK2, einer Transferase. Die für die Interaktion mit GRAF wichtige Domäne ist hierbei die SH3 Domäne. Da in keinem der Köderkonstrukte zwischen pLexA und GRAF Mutante die SH3 Domäne enthalten ist, können die beiden Proteine nicht miteinander interagieren. Deshalb wertete ich die schwache Blaufärbung zwischen FAK2 und dem Konstrukt pLexA mit Klon 8 als falsch positiv.

Sowohl mit HAT1 als auch mit TRPM2 interagierten die Fusionsproteine aus pLexA und Klon 4, 8 bzw. 11. Das könnte darauf hinweisen, dass die Interaktionsdomänen am Anfang des *GRAF* Gens liegen, der in allen drei Klonen enthalten ist.

Die schwache Blaufärbung im Interaktions Assay zwischen den Beutekonstrukten FBLN 1, WNT 7a und MAGOH und der Verbindung aus pLex A mit den Proteinen der Klone 8 und 11 wertete ich bei negativem Ergebnis dieser Konstrukte mit Klon 4 ebenfalls als falsch positiv.

Zu einer deutlichen Blaufärbung kam es bei der Verbindung von KIAA 0583 und dem Köderkonstrukt des Klon 8. Da wie beschrieben Klon 8 keine der großen *GRAF* Domänen enthält, kann die Interaktion nicht über dieselbe Domäne vermittelt sein, über die das *GRAF* Wildtyp Protein mit KIAA 0583 interagiert.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte die Struktur des *GRAF* Gens in Bezug auf Zahl und Größe der Exons weitgehend aufgeklärt und die Exon-Intron-Übergänge genau beschrieben werden. Es wurde gezeigt, dass das *GRAF* Gen aus 24 Exons besteht und die Exonlängen zwischen 37 bp (Exon 12) und 967 bp (Exon 24) liegen. Der Translationsstart, ATG, umfasst die Basen 6,7 und 8 der *GRAF* cDNA. Der translatierte Bereich erstreckt sich bis Base 2284, das Stopcodon, TAA, besteht aus den Basen 2285-2287. Die restlichen 876 bp gehören zur UTR. Die Isoform A des *GRAF* Proteins besteht somit aus 759 AS. Um den genauen Start des Exon 1 und Ende des Exon 24 herauszufinden, werden jedoch noch weitere ausführliche Arbeiten nötig sein.

Basierend auf diesen gewonnenen Daten wurden cDNA und Proteinstruktur von 14 Klonen von 10 Patienten, die an AML erkrankt sind, mit dem *GRAF* Wildtyp verglichen. Dabei handelt es sich um Patienten, die zytogenetisch den Verlust eines Allells im Bereich 5q31 aufwiesen. Von 3 Patienten wurden je zwei bzw. drei unterschiedlich lange Spleissvarianten untersucht, insgesamt wurden 14 Klone von 10 Patienten zwischen 317 bp und 2287 bp analysiert. Bei 13 der 14 Klone konnten Deletionen nachgewiesen werden, in 7 der 14 fanden wir *GRAF* Intronsequenzen in der cDNA. Bei einem dieser 7 Klone wurde die genomische DNA, die die transkribierte Intronsequenz umfasst, sequenziert. Es konnte keine Veränderung zum Wildtyp nachgewiesen werden. Die Ursache für die Retention der Intronsequenz konnte nicht geklärt werden.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass durch Deletion und Insertion von Intronsequenz in der cDNA die Proteine der untersuchten Klone nur Bruchstücke des *GRAF* Proteins enthalten. Bis auf die Nuclear Targeting Sequenz und die PH Domäne fehlen in allen Klonen die fünf wichtigen *GRAF* Proteindomänen. In einem Yeast Two Hybrid Versuch wurde die Funktion der Proteine der *GRAF* Mutanten mit bekannten *GRAF* Interaktionspartnern geprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch den Verlust der wichtigen *GRAF* Proteindomänen und dem Entstehen aberranter *GRAF* Proteine die Interaktionsfähigkeit des *GRAF* Proteins mit anderen Proteinen verloren geht.

Durch die beschriebenen Veränderung im *GRAF* Gen und seinem Genprodukt könnte es durch die fehlende Inhibierung von Rho A zu einer ungebremsten Supprimierung des Zellzyklusinhibitors p21 Waf1/ Cip 1 und damit zur Onkogenese kommen.

6 Conclusion

With the work done in this thesis the structure of the *GRAF* gene regarding the number and size of the exons could be analysed. The exon-intron boundaries could also be precisely described. We proved that the *GRAF* gene consists of 24 exons, the exon length varies from 37 bp (exon12) up to 967 bp (exon 24). The translation starts with the codon "ATG" including the bases 6,7 and 8. The translated region extends up to base 2284, the stop codon "TAA" lies at the bases 2285–2287. The remaining 876 bp are part of the UTR. The isoform A of the *GRAF* protein is composed of 759 AS. However, further investigation will be necessary to find out the exact start of exon 1 and the end of exon 24.

Based on this data the cDNA and protein structure of 14 clones derived from 10 patients who suffered from AML were subsequently compared to *GRAF* wildtype cDNA and protein. Only patients were chosen who showed a cytogenetical loss of one allell in 5q31. In 3 cases various splicing variants of the same patient were examined who differed in lengths, in total we analyzed 14 clones of 10 patients containing between 317 and 2287 bp. 13 of the 14 clones showed deletions and in 7 of 14 samples intron sequence appeared in the cDNA. In 1 of those 7 clones the part of genomic DNA was studied which contained the transcribed DNA. We could prove that the insertion of intron sequence in the cDNA did not take place because of a mutation in the genomic DNA. However, the reason of this incorrect splicing could not be detected.

Furthermore we could prove that due to the deletion and insertion of intron sequence in the cDNA the proteins of the examined clones contained only parts of the original *GRAF* protein. Except for the nuclear targeting sequence and the PH domaine the five important *GRAF* protein domains are missing in all clones.

In a yeast two hybrid assay we examined the interaction of mutant *Graf* proteins with proteins, generally known to interact with *GRAF* wildtype. We could show that with the loss of important *GRAF* protein domains and the production of aberrant *GRAF* protein the function and interaction of the mutant *GRAF* protein is impaired in comparison to the *GRAF* wildtype protein.

The described changes in *GRAF* gene and its genetic product can lead to a reduced or even totally missing inhibition of Rho A and subsequently to an uncontrolled suppression of cell-cycle-inhibitor p21Waf1/Cip1 and therefore finally to oncogenesis.

7 Anhang

A1 *GRAF* cDNA in 5' -> 3' Richtung

1 GCACCA**AT**GGG GCTCCAGCG CTCGAGTTCA GCGACTGCTG CCTCGATAGT CCGCACTTCC
 61 GAGAGACGCT CAAGTCGCAC GAAGCAGAGC TGGACAAGAC CAACAAATTC ATCAAGGAGC
 121 TCATCAAGGA CGGGAAGTCA CTCATAAGCG CGCTCAAGAA TTTGTCTTCA GCGAAGCGGA
 181 AGTTTGCAGA TTCCTTAAAT GAATTTAAAT TTCAGTGCAT AGGAGATGCA GAAACAGATG
 241 ATGAGATGTG TATAGCAAGG TCTTTGCAGG AGTTTGCAC TGTCCTCAGG AATCTTGAAG
 301 ATGAACGGAT ACGGATGATT GAGAATGCCA GCGAGGTGCT CATCACTCC **TTGGAGAAGT**
 361 **TTCGAAAGGA ACAGATCGGG GCTGCCAAGG AAGCCAAA**AA GAAGTATGAC AAAGAGACAG
 421 AAAAGTATTG TGGCATCTTA GAAAAACACT TGAATTTGTC TTCCAAAAAG AAAGAATCTC
 481 AGCTTCAGGA GGCAGACAGC CAAGTGGACC TGGTCCGGCA GCATTTCTAT GAAGTATCCC
 541 TGGAATATGT CTTCAAGGTG CAGGAAGTCC AAGAGAGAAA GATGTTTGGAG TTTGTGGAGC
 601 CTCTGCTGGC CTTCTGCAA GGACTCTTCA CTTTCTATCA CCATGGTTAC GAACTGGCCA
 661 AGGATTTCCG GGACTTCAAG ACACAGTTAA CCATTAGCAT ACAGAACACA AGAAATCGCT
 721 TTGAAGGCAC TAGATCAGAA GTGGAATCAC TGATGAAAAA GATGAAGGAG AATCCCCTTG
 781 AGCACAAGAC CATCAGTCCC TACACCATGG AGGGATACCT CTACGTGCAG GAGAAACGTC
 841 ACTTTGGAAC TTCTTGGGTG AAGCACTACT GTACATATCA ACGGGATTCC AAACAAATCA
 901 CCATGGTACC ATTTGACCAA AAGTCAGGAG GAAAAGGGGG AGAAGATGAA TCAGTTATCC
 961 TCAAATCCTG CACACGGCGG AAAACAGACT CCATTGAGAA GAGGTTTTC TTTGATGTGG
 1021 AAGCAGTAGA CAGGCCAGGG GTTATCACCA TGCAAGCTTT GTCGGAAGGG GTCGGAGGGC
 1081 TCTGGATGGA AGCCATGGAT GGCCGGGAAC CTGTCTACAA CTCGAACAAA GACAGCCAGA
 1141 GTGAAGGGAC TGCGCAGTTG GACAGCATTG **GCTTCAGCAT AATCAGGAAA TGCATCCATG**
 1201 **CTGTGGAAAC CAGAGGGATC AACGAGCAAG GGCTGTATCG AATTGTGGGG GTCAACTCCA**
 1261 **GAGTGCAGAA GTTGTCTGAGT GTCCTGATGG ACCCAAGAC TGCTTCTGAG ACAGAAACAG**
 1321 **ATATCTGTGC TGAATGGGAG ATAAAGACCA TCACTAGTGC TCTGAAGACC TACCTAAGAA**
 1381 **TGCTTCCAGG ACCACTCATG ATGTACCAGT TTCAAAGAAG TTTATCAAAA GCAGCAAAAC**
 1441 **TGGAGAACCA GGAGTCTCGG GTCTCTGAAA TCCACAGCCT TGTTATCCGG CTCCAGAGA**
 1501 **AAAATCGGCA GATGTTACAG CTGCTCATGA ACCACTTGGC AAATGTTGCT AACACCACA**
 1561 **AGCAGAATTT GATGACGGTG GCAAACCTTG GTGTGGTGTG TGGACCCACT CTGCTGAGGC**
 1621 **CTCAGGAAGA AACAGTAGCA GCCATCATGG ACATCAAATT TCAGAACATT GTCATTGAGA**
 1681 **TCCTAATAGA AAACCACGAA AAGATATTTA ACACCGTGCC CGATATGCCT CTCACCAATG**
 1741 CCCAGCTGCA CCTGTCTCGG AAGAAGAGCA GTGACTCCAA GCCCCCGTCC TGCAGCGAGA
 1801 GGCCCTGAC GCTCTTCCAC ACCGTTTCAGT CAACAGAGAA ACAGGAACAA AGGAACAGCA
 1861 TCATCAACTC CAGTTTGGAA TCTGTCTCAT CAAATCCAAA CAGCATCCTT AATTCAGCA
 1921 GCAGCTTACA GCCAACATG AACTCCAGT ACCCAGACCT GGCTGTGGTC AAACCCACC
 1981 GGCCCAACTC ACTCCCCCG AATCCAAGCC CAACCTTACC CCTCTCGCA CTTTGGCCCA
 2041 TGTTCTCGGC ACCATCCAGC CCTATGCCA CCTCATCCAC GTCCAGCGAC TCATCCCCG
 2101 TCAGCACACC GTTCCGGAAG **GCAAAGCCT TGTA**TG**CCTG CAAAGCTGAA CAT**GACTCAG****
 2161 **AAC**TTT**CGTT CACAGCAGGC ACGGTCTTCG ATAATGTTCA CCCATCTCAG GAGCCTGGCT**
 2221 **GGTTGGAGGG GACTCTGAAC GGAAAGACTG GCCTCATCCC TGAAAATTAC GTGGAGTTCC**
 2281 **TCT**AA**CCGTG GGCCCCAGCA GAACTGCTGA GCTTTACATG GTATCCATGA CAACTGCTGA**
 2341 TTCCAGTGTC GAGGCCATTT CTCTTTGCCA CTGAGAAATG CAGCGTGACT GACTCTGTTG
 2401 CTACCTGTCA ACATGAATGT TTCTGTGAGC TCTGGTGTCA CTCATCTCCA TGATCATCTC
 2461 AGCCAACATG CATCAGTACT GCAAGAAAAG AAGTCAATCA GCAGAGGAGA GCATTTGATA
 2521 ACTAAGAGGA AGACTTGCAA AGCCGTTTTT TCATGAGTAC CCTGAATAGG GGGCACTCAT
 2581 TTTGTTTCAA CGGTCCAAAC GCCCAACCTT CAGAAAAGAGG AAGTCAGATA GAAATAGTCC
 2641 CTGAGAGCAC ACTGTGTAGC TAAGCCTGCT GGGGCTGGGT GAAGAAATTG GCGCTGAGAT
 2701 CCAGGCTGGA TCCATTGCTT TTGTTTACAA TAGGCACTCT CTCTACCCCA CCTCTCAGTA
 2761 ATTGAGAATT AAAGTGCTAC AGGCAGCTGG ATATGTTTGC ATGCAGGATG AAGAGGGTTA
 2821 AAACACTGTT TATATAAGAT CCAATTTTTT ACCATTTTTT AAGCAGCCGT TGGCCTGTCA
 2881 TCAGTGAGAT ACAATCCAGT TTTTTTATG ACGGGAACAC ACACACCCTG CGTTTTTCCC
 2941 TCCAGGTTA GGAACTTTTT TGCCACAAAG GGCTGCCATC CATCGCTTAG TAACCACGGC
 3001 AACCCAACT ACTCTAAAAC CAAACCAAAA AAATAAAAATA ACACATCCTC TTTGCATGAC
 3061 ACATTTTTTT TCTCCCTTT TTGGTACT TTTTTTGAAT GTTTTTCTAA CAACTTGAAG
 3121 CACAGGATCA AGGAATTAGG GTGGTCTACT TGAGGCAGAT GGG

Abbildung 24 CDNA Sequenz des *GRAF* Gens

Translationsstart und –ende sind fett gedruckt. Unterstrichen sind die **Targeting Sequenz** (350-398), die **GAP Domäne** (1172-1688) und die **SH3 Domäne** (2122-2176). Die Immunglobulin **MHC-Protein Erkennungssequenz** (2135-2153) ist kursiv und fett gedruckt.

A2 Aminosäuresequenz des *GRAF* Gens

```

5> LPALEFSD CCLDSPHFRE TLKSHEAELD KTNKFIKELI KDGKSLISAL
KNLSSAKRKF ADSLNEFKFQ CIGDAETDDE MCIARSLQEF ATVLRNLEDE
RIRMIENASE VLITPLEKFR KEQIGAAKEA KKKYDKETEK YCGILEKHLN
LSSKKKESQL QEADSQVDLV RQH FYEVSLE YVFKVQEVQE RKMFEFVEPL
LAFLQGLFTF YHHGYELAKD FGDFKTQLTI SIQNTRNRFE GTRSEVESLM
KKMKENPLEH KTISPYTMEG YLYVQEKRF GTSWVKHYCT YQRDSKQITM
VFPDQKSGGK GGEDESVILK SCTRRKTDSE EKRFCFDVEA VDRPGVITMQ
ALSEGDRRLW MEAMDGREPV YNSNKDSQSE GTAQLDSIGF SIIRKCIHAV
ETRGINEQGL YRIVGVNSRV QKLLSVLMDP KTASETETDI CAEWEIKTIT
SALKTYLRML PGPLMMYQFQ RSFIKAAKLE NQESRVSEIH SLVHRLPEKN
RQMLQLLMNH LANVANNHKQ NLMTVANLGV VFGPTLLRPQ EETVAAIMDI
KFQNIIVIEIL IENHEKIFNT VPDMPLTNAQ LHLSRKKSSD SKPPSCSERP
LTLFHTVQST EKQEQRNSII NSSLESVSSN PNSILNSSSS LQPNMNSSDP
DLAVVKPTRP NSLPPNPSPT SPLSPSWPMF SAPSSPMPTS STSSDSSPVS
TPFRKAKALY ACKAEHDSSEL SFTAGTVFDN VHPSQEPGWL EGTLNGKTGL
IPENYVEFL > 3'

```

rot Nuclear Targeting Sequenz
orange PH Domäne
grün GAP Domäne
lila SH3 Domäne
blau MHC Erkennungssequenz

Abbildung 25 Aminosäuresequenz des *GRAF* Gens

Die Domänen sind entsprechend der Legende farblich markiert.

A3 Amplifizierung der Exons des *GRAF* Gens**Tabelle 10**
Amplifizierung der Exons des *GRAF* Gens.

	in Y10388	Exon Länge	Amplifizierte Länge	Primer intern	Primer extern
1	1-159	159 bp	260 bp	70°C, 76°C	74°C, 76°C
2	160-255	96 bp	203 bp	74°C, 76°C	72°C, 74°C
3	256-317	62 bp	109 bp	74°C, 70°C	72°C, 72°C
4	318-389	72 bp	198 bp	74°C, 72°C	72°C, 72°C
5	390-491	102 bp	178 bp	72°C, 70°C	72°C, 70°C
6	492-602	111 bp	169 bp	72°C, 72°C	70°C, 70°C
7	603-707	105 bp	166 bp	74°C, 70°C	
8	708-837	130 bp	191 bp	68°C, 76°C	
9	838-938	101 bp	176 bp	68°C, 68°C	
10	939-1033	95 bp	131 bp	72°C, 70°C	
11	1034-1112	79 bp	110 bp	68°C, 72°C	
12	1113-1149	37 bp	103 bp	70°C, 70°C	
13	1150-1215	66 bp	133 bp	66°C, 64°C	
14	1216-1290	75 bp	125 bp	72°C, 72°C	
15	1291-1378	88 bp	120 bp	68°C, 72°C	
16	1379-1437	59 bp	126 bp	68°C, 66°C	
17	1438-1543	106 bp	167 bp	64°C, 64°C	
18	1544-1703	160 bp	203 bp	68°C, 64°C	
19	1704-1842	139 bp	223 bp	70°C, 86°C	
20	1843-1993	151 bp	253 bp	68°C, 72°C	
21	1994-2104	111 bp	155 bp	70°C, 72°C	
22 AB014521	1917-2081	165 bp	275 bp	80°C, 80°C	
23	2105-2196	92 bp	209 bp	70°C, 70°C	
24	2197-3163	967 bp	1033 bp	68°C, 62°C	

A4 Die Exon-Intron-Grenzen des *GRAF* Gens

Exon 1 (bp 1-159) (Codon 1-52)

ctgcgtttcc tgctcgcgat ccgctccggt gcccgcgccc ggaacagcag cacctcggcc
 gggctccgagc tcggttcggg agtcttgccg gccggcggac accgcgcgcg gaggtagcca
gcgccacacc tgtggagccg gcggccgctc ggggagcccg ccggggtc **cc gccgcgtgag**
tgctctgggc ggcggggcggc ccggggcccc gcggaggcgc gccccccggc tgggcgcgcg
 gc
 1 GCACC
 6 **1** ATG GGG CTC CCA GCG CTC GAG TTC AGC GAC TGC TGC CTC GAT **14**
 48 AGT CCG CAC TTC CGA GAG ACG CTC AAG TCG CAC GAA GCA GAG CTG GAC **30**
 96 AAG ACC AAC AAA TTC ATC AAG GAG CTC ATC AAG GAC GGG AAG TCA CTC **46**
 144 ATA AGC GCG CTC AAG A **159 52**

gtgagtgtc ccgagcccct

cggaacgcg gctccgggac gcgaggaa **ct gggaggtggc gcttagcccg** ggttgcccgc
 gcgt **ctgccg ggtttctgct cccggta**cac tgggggacgg gtgtcgacgc ctccgaggca
 ggaaggatac gtaaagcggg cgatccagca accatcagat gaagagagag acccgtcgtc

Exon 2 (bp 160-255) (cd 52-84)

aaaatattaa cttctagaac aaatcagtgc ttcatattgt aaccaagtgt tgactatddd
 gaatttatat tcttttgc tttgaaatgg actcaggaaac aaatccgcct cctaagatat
 t **ccctagaagg accaataagg gcagc**aaatc agaaagccag ttaatttta gtaattcctg
 atttttcctg tctttttctt gctag
 160 **52** AT TTG TCT TCA GCG AAG CGG AAG TTT GCA **61**
 189 GAT TCC TTA AAT GAA TTT AAA TTT CAG TGC ATA GGA GAT GCA GAA ACA **77**
 237 GAT GAT GAG ATG TGT ATA G **255 84**

gtaagtcac aactgtgcag aagataaaaa tgttcattgt ttgtcatag **gc cttcagtgtc**
ccagcagagc cttttccctg agataggaag tctctaagg tagtaacaa agaagtcctt
 agtggaaagt gagggccaga gatatgtgag gatcggagct tggggctact ctggtcttct
 cgagttttgg gattgcctca cctccagca tgcaggagag aaagcttgaa gttttgcagt

Exon 3 (bp 256-317) (cd 84-104) AJ309467

cggggcctgg aagcctgcc gcatctcacc agtctcggat actctcagga acaggcagat
 cttttccttg aagaaatcat tccctagcta gagggccagg tggaaataac ctgcatttct
 gggctacact taatgggttaa tgattaaaa gatgaaggga gccttgggaa gcaattgact
 ttaggcactc gtatgtgcc aggaattaaa atocataaca taatagccag agctggaaag
 gctcccccaag gc **ccatgaca ctcttccac ctcatg**gccc ctttctgttt tccag
 256 **84** CA
 258 AGG TCT TTG CAG GAG TTT GCC ACT GTC CTC AGG AAT CTT GAA GAT GAA **100**
 306 CGG ATA CGG ATG **317 104**

gtg

agtagggctg ggctactctt ggtcc **cagat agtatattcg tgttgagggg** gcaagggatg
 ggtatcagaa gaactagatt caaatccaga ctctgccatt tgaatgttt gagctcttca
 gcaagcctca tctttgtaga gtttgaaggc ttttgtaaatt attaaaggat tactctggtg
 gataacttta gaacaacgta gttaaatgat gtccttctga agattcattt taaggtcttt

Exon 4 (bp 318-389) (cd 105-128) AJ309468

ttaccagttc cctctgccc cttcagagga tcgcttacag ttttagagtt cctcattttt
 actttttaat aatcagtatt aatcatgcat gggaggaaga ttatcatggt ttgaaatgat
 gacagttttg atttgacatg ctattagttc gaaggttgta aacagttgac atgtacaaca
 ctgcctcccc aaattttatt ttaagacatg gggag **ggcacc tcatgctgga gctgctg**ttaa
 ttctttactg atactgcttt tgtgtcttct ttccttact ctgttgcttct tcaccag
 318 **105** ATT
 321 GAG AAT GCC AGC GAG GTG CTC ATC ACT CCC TTG GAG AAG TTT CGA AAG **121**
 369 GAA CAG ATC GGG GCT GCC AAG **389 128**

g tgagaat ttt gcaag **ctttg gtctggattt tagggtgaga** ggtctggaaa
 acatagcacc tttctttaaa aaaaagtctt cagaaatgtc ttcagaaaat cgaagcccac
 cttcttcaga aaatcttagg cagaaaactc tatagagccc aactcatcgg tcttttacgg

Exon 5 (bp 390-491) (cd 129-162) AJ309469

cattagatat tcgtatttac ctcatttctg gtcttgcct ggttggtgcc tctctgctag
 acaactcaaac tcagggggct gttgatgggt ggctgcagga tttaatgggc attacctgaa
 aagtaggagc tgagtcgtca tctgtgttct gagcag **aagg atcttgagag atggaggctg**
 cttttattcc tgcaacgtgt tactcttttt cttttctct tctcttttt tgccag

390 **129** GAA
393 GCC AAA AAG AAG TAT GAC AAA GAG ACA GAA AAG TAT TGT GGC ATC TTA **145**
441 GAA AAA CAC TTG AAT TTG TCT TCC AAA AAG AAA GAA TCT CAG CTT CAG **161**
489 GAG **491 162**

gt aagagacttt attagtat **cc**
tgaataaagt gttcaatttg tacat gatgc tgtggatatg tgctggttgc tctttgctag
 aaaatcttag ggtagaagg gacctgggaa gccaggagat tgctcctgat ccctcatcca
 gtgcctgatg cctggactgc ctttgtgtcc tcccatccca ccccatcctt tgtagccttc

Exon 6 (bp 492-602) (cd 163-199) AJ309470

ttatttgtgg gttttttttt tttctgttga gttgagttcc ttgtatacat ttaccttttt
 aaaccaataa tctcattaga aagctttttt tttgttttaa aaaaatatgt atttaagttag
 tataatatga tgtttcagta tatttttgca tagtgaaata gttactatag ttattcttct
 tctgtgtaat gctatttgat ttgtttttga aaattatctc ccgagatttt tttttctga
 cctgctttcg **g aatgctatc cttgggtagt gacttg** attt ttctcttaaa ttccatcttg
 tttgtag

492 163 GCA GAC AGC CAA GTG GAC CTG GTC CGG CAG CAT TTC TAT GAA GTA **177**
538 TCC CTG GAA TAT GTC TTC AAG GTG CAG GAA GTC CAA GAG AGA AAG ATG **193**
586 TTT GAG TTT GTG GAG CCT **602 199**

gt
 aagtagatat tcagggttta atgat **gtacc cgtatattca tccctcattc** taactagtag
 tagattacaa aatgctctaa gttgttgatg aagaggttga gcagccctga cactgtccct
 tctgtaagta tcagtgcctt gcgagcctgg ctgccttga ttcttccag cagccattcc

Exon 7 (bp 603-707) (cd 200-234) AJ309471

ttactgtgtg ttttggggca agtttcttaa cctctctgaa cctgcttctt cattattaaa
 atggggataa cagtagtgct taggtcatgg gatggttga gtactcacc agggcatgga
 agggcatagt gcctggcaca caattgggtgc tctttaaatg tcagccatta ttattcttta
 ttttagactt tcaagccagt gttggga **gct cagatacagc tacataatac ctd** ttttcaa
 cctggttatg tgacctttgc ctttcttctt tcattacag

603 **200** CTG CTG GCC TTC CTG CAA **205**
621 GGA CTC TTC ACT TTC TAT CAC CAT GGT TAC GAA CTG GCC AAG GAT TTC **221**
669 GGG GAC TTC AAG ACA CAG TTA ACC ATT AGC ATA CAG AAC **707 234**

gtgagt gggcatagg **g acaggcttct tttatctggt**
taag gaaaaa caaaatatgg gcctgattgc cctagaaacc atccagggtg cttggaatgt
 aggtgaggag ggtgggtctt gcttgggttc agagggaaac taggggcagg cgtttctaga
 gtgcttggtg gttctgagtt agaccatcat cctcttctcc attatttcaa agccctattt

Exon 8 (bp 708-837) (cd 235-278) AJ309472

ttgatagtca cttaggtttg agagtcattc tggatagga cttaaggcc aaagtatact
 tgtcataagg gactatttgg ccagttcctg gaaggttga tgctctttat ctcatttttag
 atctaaggat tctattaggt **tgatctggat tgttgaaaca gatac** tttgt tcttttgatt
 tgaataaaat tattttcctc cttag

708 **235** ACA AGA AAT CGC TTT GAA GGC ACT AGA TCA **244**

738 GAA GTG GAA TCA CTG ATG AAA AAG ATG AAG GAG AAT CCC CTT GAG CAC **260**
 786 AAG ACC ATC AGT CCC TAC ACC ATG GAG GGA TAC CTC TAC GTG CAG GAG **276**
 834 AAA C **837 278**

gtgagt gctttgacta gcaaca**gctt**
gggatgtact caggcctctt aacctagaagg tggaggatgt attcagcagt gcctacctta
 ctgtagatac atgcttggat aacaagaaca attttatagt tcacctttcc aaagagaaag
 atgatgtcca cagaatcttg tctacctttg tttttcttta tgaatgggaa ttcctttggg

Exon 9 (bp 838-938) (cd 278-311) AJ309473

tcccgggggtt ggtttcattt gagcctgtgg gatcagattt ctgtctattc attctagcta
 gtgtggagaa tatattactt ctaacatagt ttaagggtag atgagcatta tgaattatgg
 gttgtgggtt t**ccagctca tgatgtatag cata**cagtgg aatgtataga tattttatgg
 gaaatattac ctttcag

838 **278** GT CAC TTT GGA ACT TCT TGG GTG AAG CAC TAC TGT **289**
 873 ACA TAT CAA CGG GAT TCC AAA CAA ATC ACC ATG GTA CCA TTT GAC CAA **305**
 921 AAG TCA GGA GGA AAA GGG **938 311**

gt
 gagttcattt ttaaaatttg atgtttgatt t**gcttggcta acatataatg attataat**gc
 atgtataaag taacacctcc agtgttatat ttatgtttca tcataaattt aaaattaata
 atttaaaaaa tttttatata gtagttccag gaagccctaa gaggctgaag aatcgctaaa

Exon 10 (bp939-1033) (cd 312-343) AJ309474

tcttgaaag gtttatagtc acccttcac tgcccattgt catgagcact cagatttgag
 aagatgaaat gattgctcct gtttacatgt catgtatgtc ctgggaggag tagagctccc
attctggcct catcttgata gtctgtgtgt tcccactag

939 **312** GGA GAA GAT GAA TCA GTT **317**
 958 ATC CTC AAA TCC TGC ACA CGG CGG AAA ACA GAC TCC ATT GAG AAG AGG **333**
 1006 TTT TGC TTT GAT GTG GAA GCA GTA GAC AG **1033 343**

gtgagt agctagcatg cttttct**cag gagcaaatag agctgaattt**
ctatatactta ctttttcttt ccagtcaaac cttttctgct tttttccctc tctccctc
 cctccttctc ttccttctcc cctgcctcc ttcctttcct tctccatcca ttcattatg
 tccaggggtgc tggatccagg ctattgctga tttgogagaa tcattagaac ctccctatct

Exon 11 (bp 1034-1112) (cd 343-369) AJ309475

taggatcatg tcttctgtgt ttctgcctct ctgagggaga tgggctgact gagaggaatt
 tgggcccgtcc tttctgagag tagaaggtgg cttagtaaag ccgagtgttt tgcccctctt
 tgtgttgta accctagcag cactgactc ttttgagtgg atgtttaaga tttgccttca
 ccaatctctc tacatgt**ggc actggtttca tatccatgtc** cctcctttct ctgcag

1034 **343** G CCA **344**
 1038 GGG GTT ATC ACC ATG CAA GCT TTG TCG GAA GGG GAC CGG AGG CTC TGG **360**
 1086 ATG GAA GCC ATG GAT GGC CGG GAA CCT **1112 369**

gtaag taacaattca **gggaagtaga gcaagaatga aggcc**ctgag
 ttgtttgttg cttccctagt gcagtgattt ttgctgctgt tctaaagcct tgggttcttg
 aaaccagtgt accagaggtg gttttttatt cctaggttta tgtttgtgga tattgatatt
 gcttctgtat agatgtagtt cttgagcttt ggctctctg tccaaagga tggcttctgc

Exon 12 (bp 1113-1149) (cd 370-382) AJ309476

atgtacgcat atacatttac ttgctttctt aaaaagaggg aattttttt tacacaataa
 agttgcacag atgattctga tgcacacaca cttagaaca gctaaagtaa atactgagaa
 gtagataatt attgaatggg ttcatgtttg ggagccagaa attaccttcc acttcatggt
 gcaaaactagg gaaagtgagg aagataatgg **ttttctacag tgaacctata gggtg**gcata
 aaatgcatat aagtgaattt ttatttttat tttccag

1113 **370** GTC TAC AAC TCG AAC AAA **375**

1131 GAC AGC CAG AGT GAA GGG A **1149 382**

gtaagt acgatgcttg ggtaaccttc **tacagccagg gttgggagta**
ggctttgaga agttgctact ccagggtgtga accaccaggc ggtgctgtgg gcgtggtggg
 ttggctccag ttcccagagt cagtgggaca tgccctccacc ccaactttcc gccagtgact
 ccagagggac ggtaagtgag cctggctggc aaggctgtag tgtagtgaca ccttgcatgg

Exon 13 (bp 1150-1215) (cd 382-404) AJ309477

aaaaccatac cttagcatatg gaaagctctc aatcaatgcc agctattatt attattatta
 tgttattcct gtactgttat tgggaaaaaac taaaaggata tgtgaccaca gcatgagatt
gattcatcct ggtttgggta agccctatcc tgaggttgat ttccatggct agcaactga
 ctgtccttct cttgctcttt cag

1150 382 CT GCG CAG TTG GAC AGC ATT GGC TTC AGC **391**

1180 ATA ATC AGG AAA TGC ATC CAT GCT GTG GAA ACC AGA G **1215 404**

g taaagta **gtt taacagatgg cattgttctc**
 atagaaggtc acgcatctgg tgaggagtca gaacctgtac ctgctgtttc ctgactttaa
 gtgactcatt agctcccaaa gtgccattgt cagtggattt ccacaagtct tgttggtctc
 aagcaggagg tcctaactga ttttgtgtca ccaacttctt tggctgatca gaagaatgtg
 ttaaatatct aaaatacgtg tgattataga aaccagttac tgaaattcga tttttaaaat

Exon 14 (bp 1216-1290) (cd 404-429) AJ309478

gaactaacat gagggtgaa gtgtgcagca catccgtgaa atcctagaca gctgtaccaa
 atcccactcg tttgctaaga gctgagctga gtgacagggg actttaatta gagcagcttt
 taggaggact gagaaaatga aaaaaaaaaa aaaaaaaagt gcatttggct ggatt **ggcct**
gacttgtggt ctgacgtgcc totaattaaa tcatcactgt ttctttctc ag

1216 404 GG ATC **405**

1222 AAC GAG CAA GGG CTG TAT CGA ATT GTG GGG GTC AAC TCC AGA GTG CAG **421**

1270 AAG TTG CTG AGT GTC CTG ATG G **1290 429**

gtg agtgccgcag tgg **ctctgct aggcaggctcc ctgg**atgggg ggcccactct
 gaaaagtcac cagggtctgtg agtagatata gcctgtggca aaggaatcgg ggtgtccgtg
 agctgtcacc tagaagtcac ctgccccatc ggtcagttgt catggcttca gacactgtg
 ggaaaggttc tgagtaggac tggacaaaat aaaaaatgcc agggcccaga caccacacc

Exon 15 (bp 1291-1378) (cd 429-458) AJ309479

gcttctcaaa actcttgcac ttgtctctcc tgctgccagc aggataggag aggatcagtt
 tcaactgcatt cttgccagca agagatattg gaatttttag acattttcct aatttaatag
 gtaaaaaaaaa tacttgtcat ttttgtttta ctttgcattt ctctagttac tagcaagatt
 ggatgccttt atgtgtgctt atttattagt tcca **ttttat gctgtgcttt atgtattgtc**
 ttttcttcat tttag

1291 429 AC CCC AAG ACT GCT TCT GAG ACA GAA ACA GAT ATC **440**

1326 TGT GCT GAA TGG GAG ATA AAG ACC ATC ACT AGT GCT CTG AAG ACC TAC **456**

1374 CTA AG **1378 458**

gtagga ctttccattt
gcaaggcaga gtgccagcta gttatcatgc aatcaggaag aaagcagttt tattttcaga
 ctccggagag ctgtcgggtg ggtgtttgag atgtggaaac agcttctgtg tgggtgcggt
 tagctcagct ggtcaaacca atcgtaaatc atccatagtt gatgggttgc ctttgtgcag
 tgacaccctg agtgatttag gaaactttgt tctatatgag aagtattgtg ataattagcc

Exon 16 (bp 1379-1437) (cd 458-477) AJ309480

gactgaaaag gaaatctctt agtttgtgtt agactcttgc attagcacta ttttagtggt
 gacaatgaaa catagttgtg tctattcatt taagaaagag agagaataaa cattttgggt
 gaaactctag aacgcttgca atagggaaac tacattgta ttgtttccct gtgatctttg
 tcttcgagaa atgtattaca gtttgcagt ctctaggctg ctatttagag agaataatgat
 tattcttat **attaagctga ctagcctatc tcc**ttttcct ccag

1379 **458** A ATG CTT CCA GGA CCA **462**
 1396 CTC ATG ATG TAC CAG TTT CAA AGA AGT TTC ATC AAA GCA GCA A **1437 477**
 gtaagtc ttttttgtct

cagttttaag ggggaagagaa tagatttttc tattttcaaa **g aagagtcagt atcccaaaat**
aaatattacc taacccttcg tattctgcac ataaactggc cacataacat actcatgaga
 ttctaacacg gaataaaaag gaaacaaata gggattgcta agggcctttc taccacattg
 aatttacagc agaggacaga aacttcagaa gtcttttttt tttttttttt ttttttttgag

Exon 17 (bp 1438-1543) (cd 477-510) AJ309481

tgacaatttt tttggcaacc ctgttcacaga aagcaccatt aaaaggactt ccagatctag
 tcatgctggc cacgcagtat gcacacaaga caggattgta aatctttgag aaatccttgg
 gctgttagtg ctcatccttt ggtttccctt aatttttcaa ccttaaagtt **gtttagctgt**
gacactgata agatattacc tcctccttc ctttgcag

1438 **477** AA CTG GAG AAC CAG GAG **482**
 1455 TCT CGG GTC TCT GAA ATC CAC AGC CTT GTT CAT CGG CTC CCA GAG AAA **496**
 1503 AAT CGG CAG ATG TTA CAG CTG CTC ATG AAC CAC TTG GCA AA **1543 510**
 gtaggt ttaagaccaa ttactagcct ttttcttacc
cctgaaagtt cttatcttag cagtgaagct ggtctcagtt ctgcttttgt ttctctctcc
 cactattgca tcaggtatgc tggaggctta ggaaagaaat gtgtgaaatg ttcattgcag
 tggagaacag cagcaaatgc cagatggcct tcccagagga tgctggggaa gtgctcatgc

Exon 18 (bp 1544-1703) (cd 510-563) AJ309482

agattttctga aatgtggtag attttctgac tctgtggca tctgacgatg acccaagttc
 tggctcctac agatgaggag tctataaata ggaagatagg aaggatacag ggtggttgg
atctctgtgt acacgattg tctcattgggt accttttctt ttccttcctc ccag

1544 **510** T GTT **511**
 1548 GCT AAC AAC CAC AAG CAG AAT TTG ATG ACG GTG GCA AAC CTT GGT GTG **527**
 1596 GTG TTT GGA CCC ACT CTG CTG AGG CCT CAG GAA GAA ACA GTA GCA GCC **543**
 1644 ATC ATG GAC ATC AAA TTT CAG AAC ATT GTC ATT GAG ATC CTA ATA GAA **559**
 1692 AAC CAC GAA AAG **1703 563**

gtaata tgtaatt **gat cacttgcagt**
gaagaatgta cctgggggga agctgcattg gaattgacct tcagagttgg ctgagatttg
 cattgctaact cactcttaca ctgtcatgac gatgaagttg ctggtggtgg tagtgatggt
 ggtgatgata atgtaagggt ggtggtaaag gtgtcaaccg tggtagttac aatgacaaca

Exon 19 (bp 1704-1842) (cd 564-609) AJ309483

ggaaattgtg gcagaagagg ttagaaatgg aagtgggtgg ttatcaaact ctgggataag
 ctcccaaca agaatgttta atgccatttc ctagaaaagt taaaatgaa gtcttgaaca
 actgccagtg gtcttctcgg atcttttctt gctaattoca agacactgcc aagctttccg
 ttgtactgct tcaggcctgt tttcttc **cca gtccacagat gtgagtaacc** ttgttgtgaa
 acttcgtttg cag

1704 **564** ATA TTT AAC ACC GTG CCC GAT ATG CCT CTC ACC AAT GCC **576**
 1743 CAG CTG CAC CTG TCT CGG AAG AAG AGC AGT GAC TCC AAG CCC CCG TCC **592**
 1791 TGC AGC GAG AGG CCC CTG ACG CTC TTC CAC ACC GTT CAG TCA ACA GAG **608**
 1839 AAA C **1842 609**

gtgagtct ttgctgcata gggccagcgt
 ggcattcagg gacatcccat gctacctgca cgg **ctcaggg tggacacttc cagcttttct**
ctggtgtgcta ctggcttttt gtgtccttga agactgtatc attgtgccct cccaagtgcc
 tttgctgagt aaccctgata ggacaggaag caatattatt gagaatgaaa gagaagggct

Exon 20 (bp 1843-1993) (cd 609-660) AJ309484

tcctggctta tattaaggg gagatatatc ctggtatgac gaggaaaggg gtttgcttta
 aaatttcgag tcacctgttc ccccttgact cttoctttcc cacttttaaat tcttaacctt
 ttctatgttg tttcttaagc ttccctggga tcagagatct tgatccagtc ttattcttta
 tacatttttg **tgcatgtagc aatagactgt cc**ctatgcaa taatattaat atgggacttg
 tggcttttcc cccccag

1843 **610** AG GAA CAA AGG AAC AGC ATC ATC AAC TCC AGT **620**

1875 TTG GAA TCT GTC TCA TCA AAT CCA AAC AGC ATC CTT AAT TCC AGC AGC **636**

1923 AGC TTA CAG CCC AAC ATG AAC TCC AGT GAC CCA GAC CTG GCT GTG GTC **652**

1971 AAA CCC ACC CGG CCC AAC TCA CT **1993 660**

gt aagtatgatg
 tccagctgcc taccacaaa gggctttggt cagccattcc acctaga**gaatt tgctgtctgg**
ctccatctga ctttggaacca ttatccctg aacattattt aaacctcctc cctaaactgg
 gagctcagct ggcctgtgtg gggtttttaa agcatcatca tctcagaggg agtcgttatt

Exon 21 (bp 1994-2104) (cd 660-697) AJ309485

catttgctgc caatgtacat gatcgaagaa gcttctatca cctgaaaagc agttgttctg
 cagggcaag cctgtttata ctccgaggaa ttacagaaca gacgtttact tggacgtgga
 gatttggtct ggaggaatgt gacatggccc tgacagcaca tccctgggtt tccgtgctcc
 tctgctctgc ccagctttcc gtcactgtgc **ctcccatgac ctctgtgtct cc**cattgtgg
 tttccct**gtg tgctgacaag ttttctgggtt g**ttatgtctt gcag

1994 **660** C CCC CCG AAT **663**

2004 CCA AGC CCA ACT TCA CCC CTC TCG CCA TCT TGG CCC ATG TTC TCG GCG **679**

2052 CCA TCC AGC CCT ATG CCC ACC TCA TCC ACG TCC AGC GAC TCA TCC CCC **695**

2100 GTC AG **2104 697**

gtctg ttgcagggtt tgtttggttt
tctgttgctg ccgttgttct ctcaattggct cggctcctctc ttcatgcagt gttcagcctc
 ctcgtaact ttgttcctg ccatccaaac ctgcacttgc tttttgacag gccagaagaa
 gcggtacatg aagactccag gtaaaatctc ggatgatgac caatctgttc ccgtttatcc

Exon 22 (bp 1917-2081 im zerebralen Transcript, AccNo AB014521) AJ309486

gacgtggaga tttggtctgg aggaatgtga catggccctg acagcacatc cctgggtttc
 ggtgctcctc tgcctctgcc agctttccgt catctggcct cccatgacct cctgtgctcc
 cattgtgggt tccctgtgtg ctgacaagtt ttctgggtgt tatgtcttgc agcccccca
 atccaagccc aacttcaccc ctctcgccat cttggcccat gttctcggcg ccatccagcc
 ctatgcccac ctcatccacg tccagcgact catccccctg cag

G TCT GTT GCA GGG
 TTT GTT TGG TTT TCT GTT GCT GCC GTT GTT CTC TCA TTG GCT CGG TCC
 TCT CTT CAT GCA GTG TTC AGC CTC CTC GTC AAC TTT GTT CCC TGC CAT
 CCA AAC CTG CAC TTG CTT TTT GAC AGG CCA GAA GAA GCG GTA CAT GAA
 GAC TCC AG

gt aaaatctcgg atgatgacca
 atctgttccc gtttatccaa agctggccag ggacaacagg gggctgcccc tgcctcctg
 tggttccatc ctaagagacc agagctaaaa gggaccattt gcatgaatca gcatggcatt
 tttcacaccc ttttcaaccc tgactcaagt ttctgaatta acctctctgg tgcttagagt
 taggggaagg agcacctcct gaaccagact ctgggtttga tggctctctc aatttcatgt
 gctctctgca ctttggtgta agataacata agaggaaaca gtgttgggac atgtgccaac

Exon 23 (bp 2105-2196) (cd 697-727) AJ309487

aggtgacccc acaaaaagtg tagtttcttg aagcttatgg cttttctctg aatattttctc
 atttttctcc tgtgatcttt gcagctttcc cacctcatgt cttgccatct ggctgccttg
 ccaggcactt cccacgagag gggacta**ggt agcttacagg gaaaggggaag** aagagagatg
 aaatgtctgg ggcctttctaa gggttttttc aaaaatgta aataaactcc tgttttcaca
 cag

2105 **697** C ACA CCG TTC CGG AAG GCA AAA GCC TTG TAT GCC TGC AAA **710**

2145 GCT GAA CAT GAC TCA GAA CTT TCG TTC ACA GCA GGC ACG GTC TTC GAT **726**
2193 AAT G **2196** **728**

gtgag tttctcatcc cctcaciaaag
 atatggggcgg ggggccccggg **caaggggagc acataaataa ctg**gcattttt caaagctcct
 cccgagggaa aatctcaata caatgggtaa gaaaaaaagt gtgtgtgcgt ctgtgtgtgt
 tggtttctgt gtcttttccc aaaataaaat agcagcagca ggacttccgg agacattgtg

Exon 24 (bp 2197-3163) (cd 728-757) AF508552

tctgtgtctg tttccttttt cattgtaaag aaagtccagg acagctttca tcagaaggct
 tatattccac aaaaggttca gaacctttgg tttaaacttc tagaatgatg taacttaata
 agtgattgta ctctattgtcc aagcttcctt catacacaca cacacacaca cacacacaca
 cacacacaca cccccacac acatctgcg **cctgctctat ctgtaatgcc atc**tcttctc
 gctttctctc ccttctctgt acag

2197 **728** TT CAC CCA TCT CAG GAG CCT GGC TGG TTG **737**

2226 GAG GGG ACT CTG AAC GGA AAG ACT GGC CTC ATC CCT GAA AAT TAC GTG **753**

2274 GAG TTC CTC **TAA 2285 757**

CCGTGGG CCCAGCAGA ACTGCTGAGC TTTACATGGT
2323 ATCCATGACA ACTGCTGATT CCAGTGTCGA GGCCATTTCT CTTTGCCACT GAGAAATGCA
2383 GCGTGAAGTGA CTCTGTTGCT ACCTGTCAAC ATGAATGTTT CTGTGAGCTC TGGTGTCACT
2443 CATCTCCATG ATCATCTCAG CCAACATGCA TCAGTACTGC AAGAAAAGAA GTCAATCAGC
2503 AGAGGAGAGC ATTTGATAAC **TAAGAGGAAG ACTTGCAAAG CC**GTTTTCTC ATGAGTACCC
2563 TGAATAGGGG GCACTCATT TGTTCACACG GTCCAAACGC CCAACCTTCA GAAAGAGGAA
2623 GTCAGATAGA AATAGTCCCT GAGAGCACAC TGTGTAGCTA AGCCTGCTGG GGCTGGGTGA
2683 AGAAATTGGC GCTGAGATCC AGGCTGGATC CATTGCTTTT GTTACAATA GGCACCTCT
2743 CTACCCACC TCTCAGTAAT TGAGAATTAA AGTGCTACAG GCAGCTGGAT ATGTTTGCA
2803 GCAGGATGAA GAGGGTTAAA AACTGTTTA TATAAGATCC AATTTTTTAC CATTTTTTAA
2863 GCAGCCGTTG GCCTGTCATC AGTGAGATAC AATCCAGTTT TTTCATGCAC GGGAACACAC
2923 ACACCCTGCG TTTTTCCCTC CCAGGTTAGG AACTTTTTCTG CCACCAAGGG CTGCCATCCA
2983 TCGCTTAGTA ACCACGGCAA CCAACCTAC TCTAAAACCA AACCAAAAAA ATAAAAAATAC
3043 ACATCCTCTT TGCATGACAC ATTTTTTTT TCCCTTTTTT GGTACACTTT TTTTGAATGG
3103 TTTTCTAAC **CA ACTTGAAGCA CAGGATCAAG GA**ATTAGGGT GGTCTACTTG AGGCAGATGG
3163 G

atagtagct gggaaactgtt cctttctga
 ttaatttcag cagcatcgga atatatttgg agcacacct agtaacctct tgagattaaa
 ttacatagtc ttaatatctc tgttctctca tgcaactgat gtttgTTTT taaagggtaa

Die Exon-Intron-Übergänge des GRAF Gens

Kursiv gedruckt ist die Accession Nummer des Exons in Pubmed.

Fett gedruckt ist die Nummerierung der **Basenpaare** der cDNA des GRAF Gens, in rot die **Codonnummern** des GRAF Gens, gelb unterlegt die **Primersequenzen**.

In Kleinbuchstaben: Intronsequenz, in Großbuchstaben: Exonsequenz.

mA5 Klone, in denen das *GRAF* Gen enthalten ist.

Tabelle 11

Die Bezeichnung der Klone entspricht ihrer Accession Nummer. In der ersten Spalte sind die Exons des *GRAF* Gens aufgelistet, die zweite Spalte gibt die Stelle des Exons in der *GRAF* cDNA wieder, in der letzten Spalte wird die Position des jeweiligen Exons im Klon angegeben.

AC 008533

Exon 1	1-159	212008-211850
Exon 2	160-255	109365-109270
Exon 3	25-317	107655-107594
Exon 4	318-389	103391-103320
Exon 5	390-491	97467-97366
Exon 6	492-602	88527-88417
Exon 7	603-707	80830-80726
Exon 8	708-837	79225-29096
Exon 9	838-938	75061-74961
Exon 10	939-1033	69566-69472
Exon 11	1034-1112	50718-50640

AC 012630

Exon 6	492-602	150413-150303
Exon 7	603-707	412640-142536
Exon 8	708-837	141035-140906
Exon 9	838-938	136874-136774
Exon 10	939-1033	131557-131463
Exon 11	1034-1112	112714-112636
Exon 12	1113-1149	30453-30417
Exon 13	1150-1215	6977-6912

AC 005348

Exon 12	1113-1149	72430-72394
Exon 13	1150-1215	49330-49265
Exon 14	1216-1290	44708-44634
Exon 15	1291-1378	32085-31998
Exon 16	1379-1437	30496-30438
Exon 17	1438-1543	28882-28777

AC 004782

Exon 18	1544-1703	180186-180027
Exon 19	1704-1842	167207-167069
Exon 20	1843-1993	153943-153793
Exon 21	1994-2104	93976-93866
Exon 22		93865-93701
Exon 23	2105-2196	87177-87090
Exon 24	2197-3163	78816-77850

A6 Primersequenzen

Tabelle 12

Primer zur Amplifizierung der Exons des *GRAF* Gens

Alle hier aufgeführten Primer binden im Intron.

GRAF Gen	Bezeichnung	Orien- tierung	Extern / intern	Nukleotidsequenz (5'-3')
Exon 1	C Exon 1 up int	S	intern	CCGCCGCGTGAGTGCTCTGG
	C Exon 1 up ext	S	extern	AGCCAGCGCCACACCTGTGGAG
	C Exon 1 do int	AS	intern	CGGGCTAAGCGCCACCTCCCAG
	C Exon 1 do ext	AS	extern	TACCGGGAGCAGAAACCCGGCAG
	Exon 1 do	AS		CCCTTCAGTGAGTATTCGCGCGA
Exon 2	C Exon 2 up int	S	intern	CCTAGAAGGACCAATAAGGGCAGC
	C Exon 2 up ext	S	extern	TGTGCTTTGAAATGGACTCAGGAAC
	C Exon 2 do int	AS	intern	GGCTCTGCTGGGACACTGAAGGC
	C Exon 2 do ext	AS	extern	GGACTTCTTTGTTTACTAACCTTAGAG
Exon 3	C Exon 3 up int	S	intern	CCATGACACTCCTTCCACCTCATG
	C Exon 3 up ext	S	extern	CATAATAGCCAGAGCTGGAAAGGC
	C Exon 3 do int	AS	intern	TCCCTCAACACGAATATACTATCTG
	C Exon 3 do ext	AS	extern	TGGATTTGAATCTAGTTCTTCTGATAC
Exon 4	C Exon 4 up int	S	intern	GGCATCTCATGCTGGAGCTGCTG
	C Exon 4 up ext	S	extern	TAAACAGTTGACATGTACAACACTGC
	C Exon 4 do int	AS	intern	TCTCACCTAAAATCCAGACCAAAG
	C Exon 4 do ext	AS	extern	AAAGAAAGGTGCTATGTTTTCCAGAC
Exon 5	C Exon 5 up int	S	intern	AAGGATCTTGAGAGATGGAGGCTG
	C Exon 5 up ext	S	extern	CTGAGTCGTCATCTGTGTTCTGAG
	C Exon 5 do int	AS	intern	ATGTACAAATTGAACACTTTATTCAGG
	C Exon 5 do ext	AS	extern	GAGCAACCAGCACATATCCACAG
Exon 6	C Exon 6 up int	S	intern	AATGCTATCCTTGGGTAGTGACTTG
	C Exon 6 up ext	S	extern	AGTTACTATAGTTATTCTTCTTCTGTG
	C Exon 6 do int	AS	intern	GAATGAGGGATGAATATACGGGTAC
	C Exon 6 do ext	AS	extern	TTAGAGCATTGTTGTAATCTACTACTAG
Exon 7	Ex 7 up	S	intern	GCTCAGATACAGCTACATAATACCTC
	Ex 7 down	AS	intern	TTAACCAGATAAAAGAAGCCTGTCC
Exon 8	Ex 8 up	S	intern	TGATCTGGATTGTTGAAACAGATAC
	Ex 8 down	AS	intern	TAAGAGGCCCTGAGTACATCCCAAGC
Exon 9	Ex 9 up	S	intern	TCCAGCTCATGATGTATAGCATAC
	Ex 9 down	AS	intern	ATTATAATCATTATATGTTAGCCAAGC
Exon 10	Ex 10 up	S	intern	ATTCTGGCCTCATCTTGATAGTCTG
	Ex 10 down	AS	intern	AGAAATTCAGCTCTATTTGCTCCTG
Exon 11	Ex 11 up	S	intern	GGCACTGGTTTCATATCCATGTC
	Ex 11 down	AS	intern	GGCCTTCATTCTTGCTCTACTTCC
Exon 12	Graf Exon 12 up int	S	intern	TTTTCTACAGTGAACCTATAGGGTG
	Graf Exon 12 do int	AS	intern	CTACTCCCAACCCTGGCTGTAG
Exon 13	Graf Exon 13 up int	S	intern	GATTCATCCTGGTTTGGTTAAGC
	Graf Exon 13 do int	AS	intern	GAGAACAATGCCATCTGTAAAC
Exon 14	Graf Ex 14 up	S	intern	GGCCTGACTTGTGTTCTGACGTG
	Graf Ex 14 do	AS	intern	TCCAGGGACCTGCCTAGCAGAG
Exon 15	Graf Ex 15 up	S	intern	TTTTATGCTGTGCTTTATGTATTGTC
	Graf Ex 15 do	AS	intern	AACTAGCTGGCACTCTGCCTTGC
Exon 16	Graf Ex 16 up	S	intern	TATTAAGCTGACTAGCCTATCTCC
	Graf Ex 16 do	AS	intern	ATTTATTTGGGATACTGACTCTTC

Exon 17	Graf Ex 17 up	S	intern	TGTTTAGCTGTGACACTGATAAG
	Graf Ex 17 do	AS	intern	CTGCTAAGATAAGAACTTTTCAGG
Exon 18	Graf Exon 18 up int	S	intern	ATCTCTGTGTACACGATTTGTCTC
	Graf Exon 18 do int	AS	intern	TACATTCTTCACTGCAAGTGATC
Exon 19	Graf Exon 19 up int	S	intern	CCAGTCCACAGATGTGAGTAACC
	Graf Exon 19 do int	AS	intern	GAGAAAAGCTGGAAGTGCCACCCTGAG
Exon 20	Graf Exon 20 up int	S	intern	GTGCATGTAGCAATAGACTGTCC
	Graf Exon 20 do int	AS	intern	CAGATGGAGCCAGACAGCAAATTC
Exon 21	Graf Exon 21 up int	S	intern	GTGTGCTGACAAGTTTTCTGGTTG
	Graf Exon 21 up ext	S	extern	CTCCCATGACCTCCTGTGCTCC
	Graf Exon 21 do int	AS	intern	GCCAATGAGAGAACAACGGCAGC
Exon 22	Graf Exon 22 up int	S	intern	CATTGTGCTCTTCTTCTCCTCC
	Graf Exon 22 do int	AS	intern	TTCAAGGCCCTATACCTTTGTC
Exon 22 neu	Graf Exon 22 up int			CCTCTCGCCATCTTGGCCCATGTTC
	Graf Exon 22 do int			GAACCACAGGAGAGCAGGGGCAGC
Exon 23	Graf Exon 23 up int	S	intern	GGTAGCTTACAGGGAAGGGAAG
	Graf Exon 23 do int	AS	intern	CAGTTATTTATGTGCTCCCCTTGC
Exon 24	Graf Exon 24 up int	S	intern	CCTGCTCTATCTGTAATGCCATC
	Graf Exon 24 do int	AS	intern	CAAATATATTCCGATGCTGCTG

Tabelle 13
Primer zur Amplifizierung der cDNA des *GRAF* Gens
 3. Spalte: Bindungsstelle in der cDNA des *GRAF* Gens.

SP 6	5' ATTTAGGTGACACTATAG 3'	
Graf Start Not1	5' GCGCCGCGCGCACCATGGGGCTCCCAGCGCTC 3'	1-23
Stig 12 B	5' ATTCATCAAGGAGCTCATCAAGGACGGGAAG 3'	107-137
Graf seq 266 up	5' GCAGGAGTTTGCCACTGTCCTCAG 3'	266-289
U seq 474 up	5' GAATCTCAGCTTCAGGAGGCAGA 3'	474-496
Stig 6 int up	5' AGATGTTTGAGTTTGTGGAGCCCCTGCTGG 3'	579-609
U seq 866 up	5' CTACTGTACATATCAACGGGATTCC 3'	866-890
U seq 1154 up	5' GCAGTTGGACAGCATTGGCTTCAG 3'	1154-1177
g6 up	5' TGCTTCTGAGACAGAAACAGATATCTGTGCTG 3'	1301-1332
Graf 1518 up seq	5' CAG CTG CTC ATG AAC CAC TTG 3'	1518-1538
AF 5-4 int up	5' ACATTGTCATTGAGATCCTAATAGAAAACCAC 3'	1666-1698
Graf 1858 up seq	5' GCA TCA TCA ACT CCA GTT TGG 3'	1858-1878
U seq 1998 up	5' CCGAATCCAAGCCCAACTTCACC 3'	1998-2020
Graf Stop	5' TTA GAG GAA CTC CAC GTA ATT TTC AGG GAT G 3'	2254-2285
T 7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	

Tabelle 14**Primer für Long Range PCR**

Oligonukleotide zur Sequenzierung genomischer DNA des Intron 24 des *GRAF* Gens

3. Spalte: Bindungsstelle im Klon AC 004782.

GRAF Exon 23 ex up	5'> CAC ACC GTT CCG GAA GGC AAA AGC CTT GTA TGC CTG C < 3'	87177-87141
GRAF Exon 23 int up	5'> GAC TCA GAA CTT TCG TTC ACA GCA GGC ACG GTC < 3'	87128-87096
GRAF Intron 24 do 4	5' > GCA GGC ACA ATC TCA TTT ACA GTG GTA ACA ACT C <3'	86849-86816
GRAF Intron 24 do 3	5'> CAT GTG ATG TGT ATG ATC TCT TAA AGC CAC TTC C < 3'	86794-86761
GRAF Intron 24 do 2	5'> GCA CAG AAC AAG CAG ACC AGA TTT TGC TCG GCA G <3'	82835-82802
GRAF Intron 24 do 1	5'> CAC CTA CCA CGT GCT AGA CAC CAT GCT AGG TCC <3'	82792-82760
GRAF Exon 24 int do	5'> GCC TCG ACA CTG GAA TCA GCA GTT GTC ATG GAT ACC <3'	78693-78658
GRAF Exon 24 ext do	5'> GTT GAC AGG TAG CAA CAG AGT CAG TCA CGC TGC <3'	78633-78601

Primer für den Yeast Two Hybrid Assay**Tabelle 15****Vektorprimer, die am pLexA Vektor binden und die Inserts flankieren**

Lex A seq up 1985	5' > GAT GAC GAA GTT ACC GTT AAG CGC CTG < 3'
LexA seq do 2310	5'> CAG GAA AGA GTT ACT CAA GAA CAA G < 3'

Tabelle 16

Oligonukleotide für den Yeast Two Hybrid Assay, die zur Hälfte am pLexA Vektor binden (hier in der oberen Zeile der Primersequenz), zur anderen Hälfte an der Patienten cDNA (hier in der unteren Zeile der Primersequenz).

Die erste Zeile jedes Primers entspricht also dem Teil, der an pLexA bindet. Die Bezeichnung 8-3a entspricht Klon 11, 12-1a Klon 8 und 28-2e steht für Klon 4.

LexAup-Graf start seq	5'> GTT ATT CGC AAC GGC GAC TGG CTG GAA TTC ATG GGG CTC CCA GCG CTC< 3'
8-3a-LexAdo	5'> CGA GCG GCC GCC ATG GTC GAC GGA TCC CCG G GG TTA GAG GAA CTC CAC GTA TTT TC <3'
12-1a-LexAdo	5'> CGA GCG GCC GCC ATG GTC GAC GGA TCC CCG G GT TTA GAG GAA CTC CAC GTA ATT TTC A <3'
28-2e-LexAdo	5'> CGA GCG GCC GCC ATG GTC GAC GGA TCC CCG G GG TTA GAG GAA CTC CAC GTA ATT TTT C <3'

A7 Aminosäuresequenzen des Patientenmaterials

Translation Klon 1

MGLPALEFSD CCLDSPHFRE TLKSHEAELD KTNKFIKELI KDGKSLISAL KNLSSAKRKF
 ADSLNEFKFQ CIGDAETDDE MCIARSLQEF ATVLRNLEDE RIRMIENASE VLITPLEKFR
 KEQIGAAKEA KKKYDKETEK YCGILEKHLN LSSKKKESQL QEADSQVDLV RQHFYEVSL
 YVFKVQEVQE RKTFFEFVEPL LAFLQGLFTF YHHGYELAKD FGDFKTQLTI SIQNTRNRFE
 GSRSEVESLM KKMENPLEH KTFSPYTMEG MPLTCRRNVP LELLG

Translation Klon 2

MGLPALEFSA CCLDSPHFRE TLKSHEAELD KTNKFIKELI KDGKSLISAL KNLSSAKRKF
 ADSLNEFKFQ CIGDAETDDE MCIARSLQEF ATVLRNLEDE RIRMIENASE VLITPLEKFR
 KEQIGAAKEA KKKYDKETEK YCGILEKHLN LSSKKKESQL QEADSQVDLV RQHFYEVSL
 YVFKVQEVQE RKMFEFVEPL LAFLQGLFTF YHHGYELAKD FGDFKTQLTI SIQNTRNRFE
 GTRSEVESLM KKMENPLEH KTISPYTMEG YLYVQEKRFH GTSWVKHYCT YQRFQTNHH
 GTI

Translation Klon 3

MGLPALEFSD CRLDSPHYRK TLMSHEA

Translation Klon 4

MGLPALEFSD CCLDSPHFRE TLKSHEAELD KTNKFIKELI KDGKSLISAL KNLSSAKRKF
 ADSLNEFKFQ CIGDAETDDE MCIARSLQEF ATVLRNLEDE RIRMIENASE VLITPLEKFR
 KEQIGAAKEA KKKYDKETEK YCGILEKHLN LSSKKKESQL QEADSQVDLV QQLTAQHELO

Translation Klon 5

MGLPALDFSD CCLDSPLF

Translation Klon 6

MGLPAREFSD CCLDSPHFRE TL

Translation Klon 7

LPALEFSGTI TAHCILDLLG SVILPTQPPR

Translation Klon 8

MGLPALEFSD CCLDSPHFRE TLKSHEAGLD ETNKFIKELI KDGKSLISAL KKEQRNSIIN
 SSLESVSSNP NSILNSGSSL QPNMNSSDPD LAVVKPTRPN SLPPNPSPTS PLSPSWPMFS
 ASSSPMPTSS TSSDSSPVRV VAGFVWFSVA AVVLSLARSS LHAVFSLLVN FVPCHPNLHL
 LFDRPGEAVH EDSSTRIRKA KGVECRQEER E

Translation Klon 9

MGLPALEFSG MISAHSNLRL TGSSNSPASA SQGTGITGVN PQAQPLEAGY L

Translation Klon 10

MGLPALEFSE QLPCLRHARI LLGR

Translation Klon 11

MGLPALEFSG CCLDSPHFRE TLKSHEAELD KTNKFIKGLI KDGKSLISAL KNLSSAKRKF
 ADSLNEFKFQ CIGETGTKEQ HHQLQFGICL IKSKQHP

Translation Klon 12

MGLPALEFSD CCLDSPAARG P

Translation Klon 13

MGLPALEFSA AIKSYSRNLK

Translation Klon 14

MGLPSLEFSD CCLDGPSPSR HLGSCSRHP SLCPSHPRPA THPPSAHRSG RQKPCMPCKA
 EHESELSFTA GTVLDDVHPS QEPGWLERTL NGKTGLIPEN KRGVPLT

A8 Vektoren

TOPO TA Klonierung

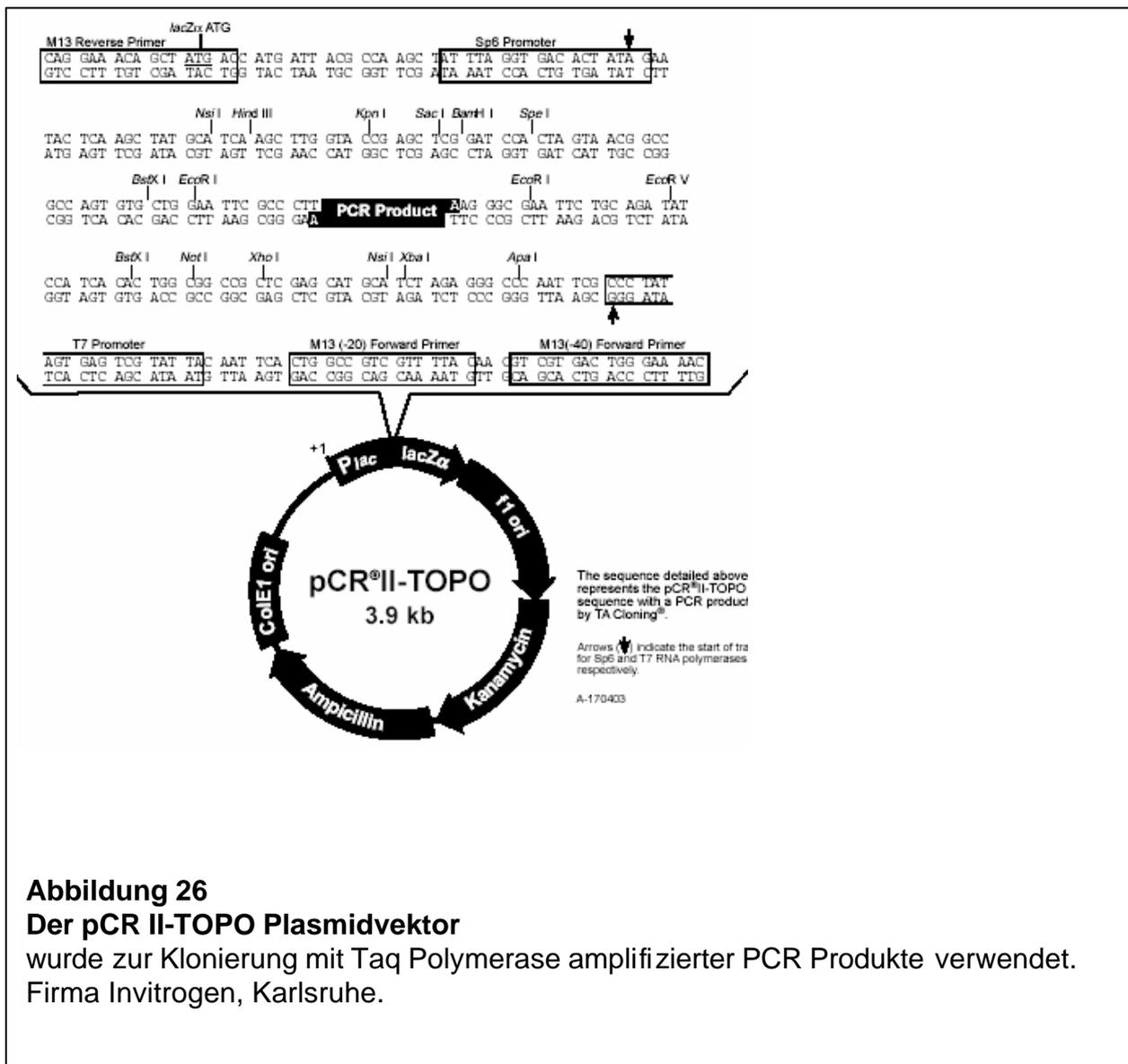


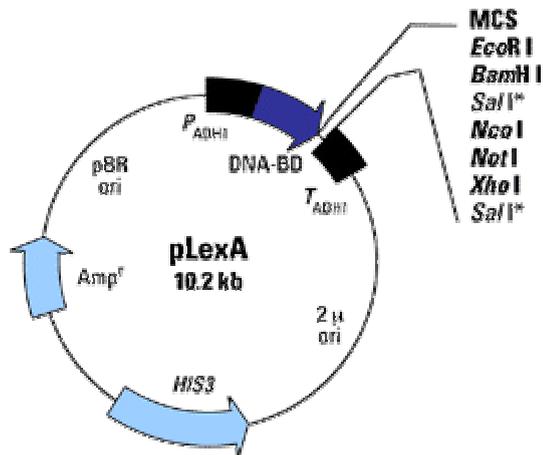
Abbildung 26

Der pCR II-TOPO Plasmidvektor

wurde zur Klonierung mit Taq Polymerase amplifizierter PCR Produkte verwendet.
 Firma Invitrogen, Karlsruhe.

Yeast Two Hybrid Assay

pLexA Vektor



MCS des pLexA Vektors

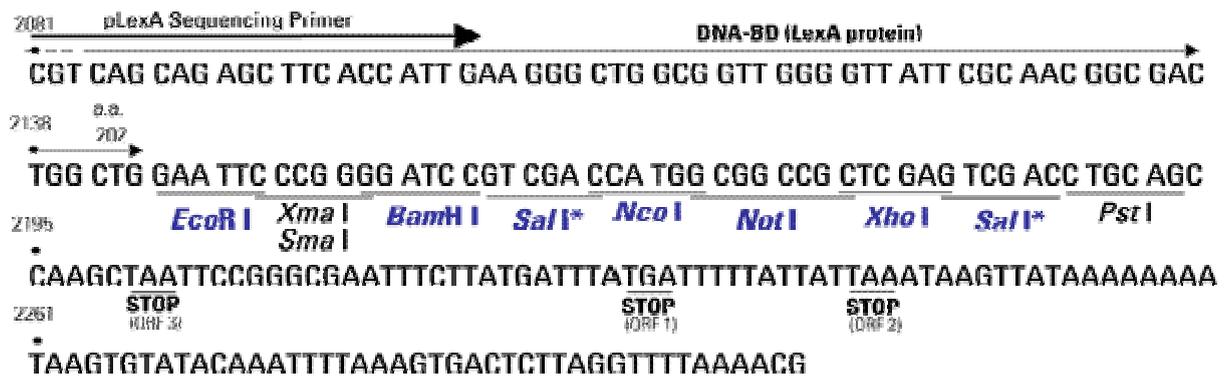
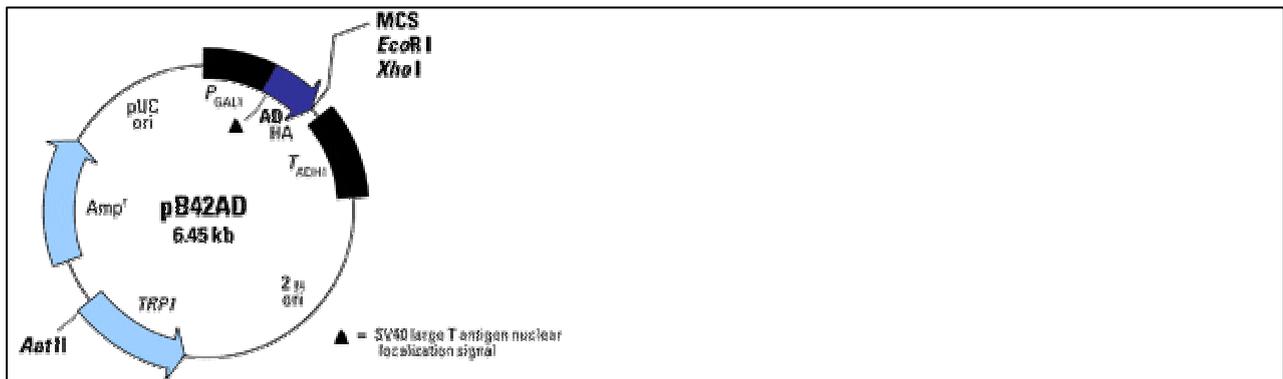


Abbildung 27

Der pLexA Vektor wurde als Träger der Köderkonstrukte verwendet.
 Firma Clontech, Palo Alto, USA.

pB42 AD Vektor



MCS des pB42 AD Vektors

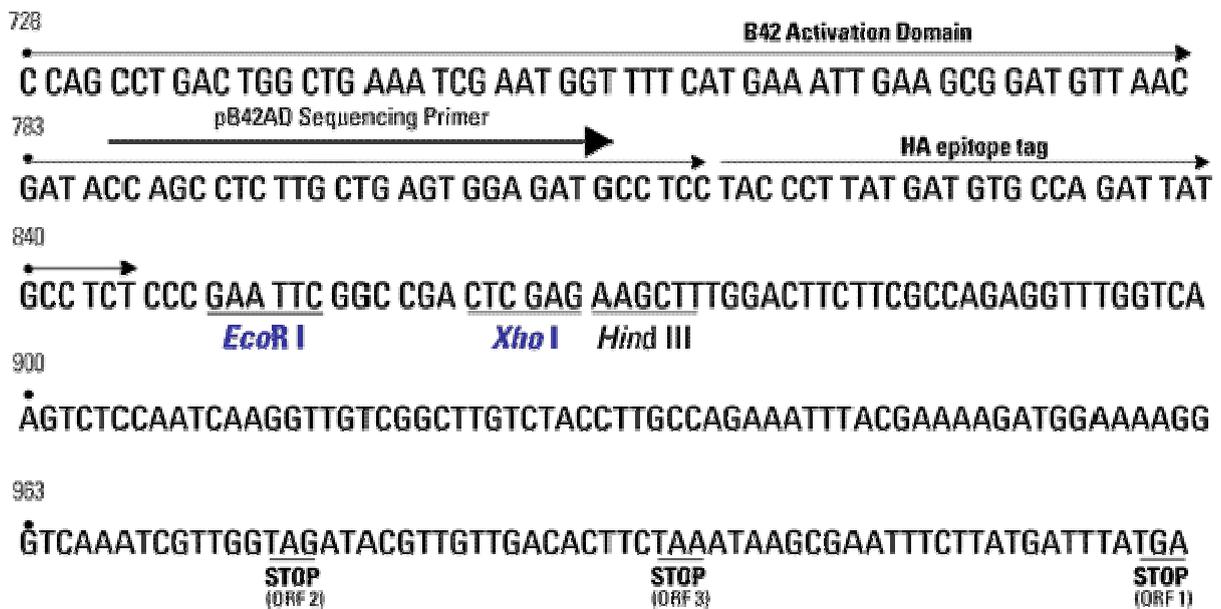
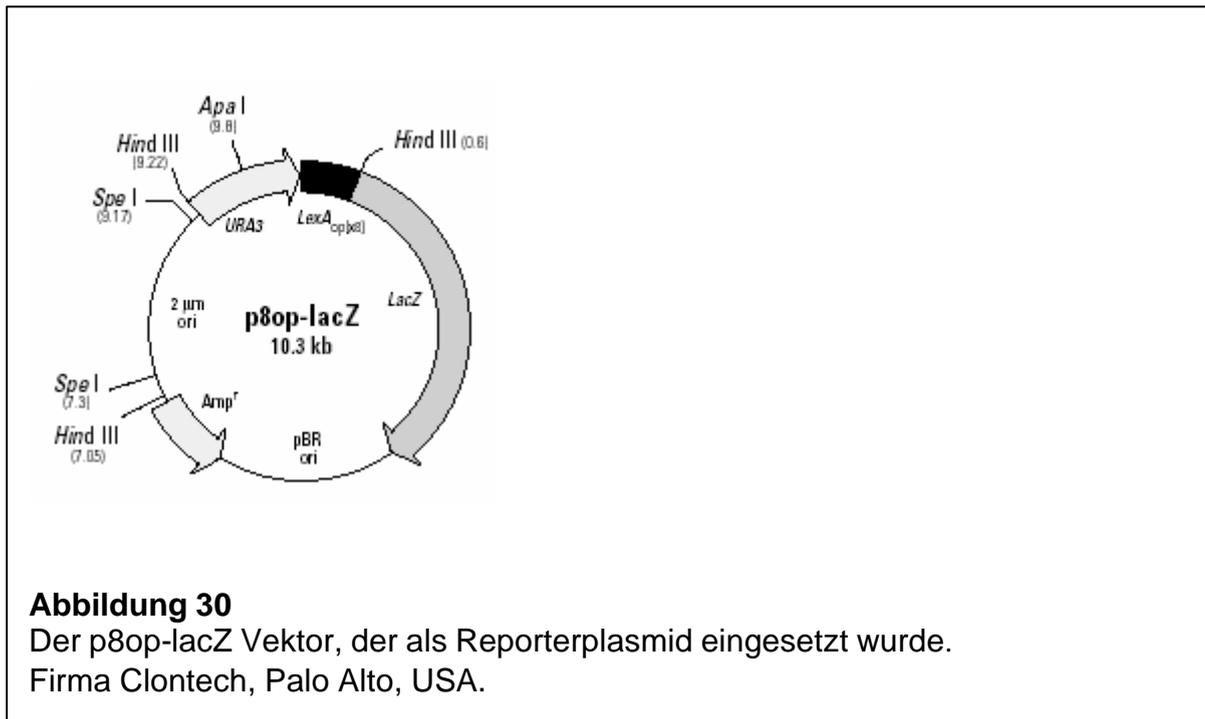


Abbildung 28

Der pB42AD Vektor wurde als Träger der Beutekonstrukte verwendet.
Firma Clontech, Palo Alto, USA.

P8op-lacZ Vektor



A9 Medien

LB (Luria-Bertani)- Medium

10g Bactotrypton
5g Hefeextrakt
10g NaCl
ddH₂O ad 1000ml
autoklavieren.

Agarplatten

10g Bactotrypton
5g Hefeextrakt
10g NaCl
15g Agar
ddH₂O ad 1000ml
autoklavieren, nach Abkühlen auf ca. 50°C benötigtes Antibiotikum (60μg/ml)
zusetzen und in Kulturschalen füllen.

10x PBS

80g NaCl
2g KCl
26,8g Na₂HPO₄ • 7H₂O
2,4g KH₂PO₄
ddH₂O ad 1000ml
pH 7,4
autoklavieren.

SOC Medium

20g Bactotrypton
5g Hefeextrakt
0,5g NaCl
2,5 ml 1M KCl
20 ml 1M Glukose
ddH₂O ad 1000ml
pH 7
autoklavieren.

YPD Medium

50 g YPD Medium Clontech, Palo Alto, USA
ddH₂O ad 1000 ml
pH 6,5
autoklavieren.

YPD Agarplatten

70g YPD Agar Medium, Clontech, Palo Alto, USA
ddH₂O ad 1000 ml
pH 6,5
autoklavieren, in Kulturschalen füllen.

Minimal SD Medium

26,7 g Minimal SD Base, Clontech, Palo Alto, USA
x g Dropout- Zusatz
ddH₂O ad 1000 ml
pH 5,8
autoklavieren.

Minimal SD Agarplatten

46,7 g SD Agar Base, Clontech, Palo Alto, USA
x g Dropout- Zusatz
ddH₂O ad 1000 ml
pH 5,8
autoklavieren, in Kulturschalen füllen.

Induktions Medium

SD Gal / Raf/ Agar Base, Clontech, Palo Alto, USA
x g Dropout- Zusatz
ddH₂O ad 1000 ml
pH 5,8
autoklavieren und nach Abkühlen bis ca. 50°C
X-Gal (80 mg/ l)
1 x BU Salts (Na₂HPO₄ · 7H₂O, NaH₂PO₄) dazugeben und in Kulturschalen füllen.

Dropout Zusätze, Clontech, Palo Alto, USA

-Ura (0,77g / l Medium)
-His/-Ura (0,75 g / l Medium)
-His/ -Trp/-Ura (0,7g/ l Medium)
-His/-Leu/-Trp/-Ura (0,6 g / l Medium)

A10 Puffer

Isolierung genomischer DNA

GEN I (10mM Tris-HCl pH 7,6, 10mM KCl, 10mM MgCl₂, 2mM EDTA, 2,5% Nonidet P-40)

GEN II (10mM Tris-HCl pH 7,6, 10mM KCl, 10mM MgCl₂, 0,4M NaCl, 2mM EDTA, 0,7% SDS)

GEN III (6M NaCl)

Isolierung von Plasmid DNA aus E. coli

Lösung I/ RNase A (50mM Tris Hcl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100µg/ml RNase A)

Lösung II (200mM NaOH, 1% SDS)

Lösung III (3.0M KAcetat, pH 5,5)

HB-Puffer (60 mM β -Glycerophosphate, 15 mM P-Nitrophenyl Phosphate, 25 mM MOPS, pH 7.2, 15 mM MgCl₂, 15 mM EGTA, 1 mM Dithiothreitol, 0.1 mM Sodium Orthovanadate, 1 mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride , 20 µg/ml Leupeptin und Aprotinin)

DNA-Waschpuffer: keine Angaben

cDNA Synthese

First Strand Buffer (250mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)

PCR Reaction Buffer (200mM TrisHCl pH 8.4, 500mM KCl, 50mM MgCl₂)

XL Puffer II: keine Angaben

Agarosegelelektrophorese

50 x TAE (242g Tris, 100ml 0,5M Na₂EDTA (pH8,0), 57,1 ml Eisessig, ddH₂O ad 1000ml, autoklavieren)

5X TAE-Auftragspuffer (10ml 50 x TAE, 50 ml Glycerin, 0,1% Bromphenolblau, ddH₂O ad 100ml)

TOPO TA Klonierung

TOPO Cloning Reaction (10 ng/ µl Plasmid DNA in 50% Glyzerin, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 % Triton X-100, 100µg/ml BSA, Phenol Rot)

SOC Mediums (2 % Tryptone, 0.5 % Hefe Extrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose)

DNA Sequenzierung

Dye Terminator Ready Reaction Mix (4µl 5 x TACS-Puffer, 1µl dNTP-Mix, 900 pmol DyeDeoxy A, 450 pmol DyeDeoxy T, 15 pmol DyeDeoxy G, 4 pmol DyeDeoxy C und 4 U Taq-Polymerase)

10 x TBE Puffer (108g Tris, 55g Borsäure, 8,3g EDTA, ddH₂O ad 1000ml)

Yeast Two Hybrid

TE/LiAc (1x TE, 01M LiAcetat, pH 7,5)

PEG / LiAc-Lösung (40 % PEG4000, 1x TE, 0,1 M LiAc, pH 7,5)

Cracking Puffer Stock Solution (8 M Harnstoff, 5% (w/v) SDS, 40 mM Tris/ HCl (pH 6,8), 01 mM EDTA, 0,4 mg/ml Bromphenolblau)

10 x BU Salze (70g Na₂HPO₄ • 7 H₂O, 30g NaH₂PO₄, ddH₂O ad 100ml, pH7, autoklavieren)

10 x SDS-PAGE Laufpuffer (10g SDS, 30,3g Tris, 144,1g Glycin, ddH₂O ad 1000ml)

2x nicht reduzierender Auftragspuffer (60µl 1M Tris HCl, pH 6,8, 312 µl 80%

Glycerin, 200µl 10% SDS, 428µl H₂O, einige Körner Bromphenolblau)

Western Blot

CAPS-Protein Transferpuffer (100ml 100mM CAPS, pH 11, 200ml Methanol, ddH₂O ad 1000ml)

TBST (20ml 1M Tris-HCl, pH 7,6, 137ml 1M NaCl, 2ml Tween20, ddH₂O ad 1000ml)

A11 Abbildungsverzeichnis

Tabelle 17

1	Onkogenaktivierung	S.6
2	MLL Partner Gene	S.13
3	Nested PCR	S.20
4	Yeast Two Hybrid Assay	S.28
5	Primer zur Herstellung der Köderkonstrukte	S.29
6	Auszug aus Sequenzierung der Transformation	S.31
7	Westernblot	S.31
8	Transformationskontrolle	S.33
9	Aufbau Westernblot	S.36
10	Beispiel <i>GRAF</i> Exon-Intron Übergang	S.39
11	Struktur des <i>GRAF</i> Gens	S.40
12	Consensus-Sequenzen	S.41
13	Consensus Donator und Akzeptorregion	S.42
14	Amplifizierung von Patienten cDNA mit SP7	S.43
15	Vergleich cDNA <i>GRAF</i> -Patienten	S.45
16	Vergleich AS Sequenz <i>GRAF</i> -Patienten	S.46
17	Primerposition Intron 24	S.48
18	Mutation Exon 23	S.48
19	Köderstruktur	S.49
20	Induktionsplatten	S.52
21	Vergleich von Exon- und Intronlänge	S.54
22	<i>GRAF</i> Gen mit Domänen	S.57
23	Aktivierung von Ras	S.58
24	A1 cDNA <i>GRAF</i>	S.66
25	A2 AS Sequenz <i>GRAF</i>	S.67
26	A8 pCRII Topo Vektor	S.81
27	A8 pLexA Vektor	S.82
28	A8 pB42AD Vektor	S.83
29	A8 pcDNA3 Vektor	S.84
30	A8 p8oplacZ Vektor	S.85

A12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 18

1	Onkogene	S.7
2	Tumorsuppressorgene	S.8
3	FAB Klassifizierung	S.11
4	Patientenmaterial	S.15
5	Zelllinien	S.15
6	<i>GRAF</i> Exons und Accessionnumber	S.38
7	Patientensequenzen	S.44
8	Yeast Two Hybrid Ergebnis	S.53
9	Vergleich Exongröße und Exonanzahl von <i>GRAF</i> , <i>hcst</i> und <i>ALL-1/MLL/HRX</i>	S.54
10	A3 Amplifizierung der <i>GRAF</i> Exons	S.68
11	A5 Klone, die <i>GRAF</i> enthalten	S.76
12	A6 Primer: <i>GRAF</i> genomische DNA	S.77
13	A6 Primer: <i>GRAF</i> cDNA	S.78
14	A6 Primer: <i>GRAF</i> Intron 24	S.79
15	A6 Vektorprimer pLexA	S.79
16	A6 Vektorprimer pLexA-Patientensequenz	S.79
17	A11 Abbildungsverzeichnis	S.88
18	A12 Tabellenverzeichnis	S.89

8 Referenzen

- 1 **B Alberts, D Bray, J Lewis, M Raff, K Roberts, JD Watson** (1989)
Molekularbiologie der Zelle, 3. Auflage, Wiley VCH, Weinheim.
- 2 **D Bartelheimer** (2004)
Sequenzanalyse des humanen *GRAF* Gens bei Kindern mit myelodysplastischem Syndrom und akuter myeloischer Leukämie und Deletion 5q
<http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2004/1799/>.
- 3 **A Borkhardt** (2002)
Tumorsuppressorgene, Die gelben Hefte, 42.
- 4 **Roche Lexikon Medizin** (1999)
4.Auflage, Urban & Fischer Verlag, München.
- 5 **Eberhard Passarge** (1994)
Taschenatlas der Genetik, 1. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart New York: 265-267.
- 6 **S Breit , J Rossler, T Fotsis, L Schweigerer** (2000)
N-myc down-regulates activin A.
Biochem Biophys Res Commun., 274: 405-9.
- 7 **A N Garratt, C Özcelik, C Birchmeier** (2003)
ErbB2 Pathways in Heart and Neural Diseases.
Trends in Cardiovascular Medicine, 13: 80-86.
- 8 **R Friedrich** (2005)
Molekulare Virologie und Onkologie.
www.med.uni-giessen.de/viro/Friedrich.
- 9 **N Potenza** (2005)
Replacement of K-Ras with H-Ras supports normal embryonic development despite inducing cardiovascular pathology in adult mice.
EMBO reports 6: 432–437.
- 10 **C Wagener** (2001)
Molekulare Onkologie: Perspektiven für Krebsdiagnostik und –therapie.
www.roche.com/pages/downloads/company/pdf/rtpenzberg01d.pdf.
- 11 **D Cortez, G Stoica, JH Pierce, AM Pendergast** (1996)
The BCR-ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras-dependent signaling pathway.
Oncogene, 13: 2589-2594.
- 12 **FG Haluska, Y Tsujimoto, CM Croce** (1987)
The t(8;14) chromosome translocation of the Burkitt lymphom cell line Dau occurred during immunoglobuline gene rearrangement.
Proc Natl Acad Sci USA, 84: 6835-6839.
- 13 www.charite.de/forschung/forschungsberichte/FOB_2003-2005/deutsch/PJ/PJ12662.html

-
- 14 www.mammakarzinom.de
- 15 **H Hildebrand** (1994)
Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 257. Auflage, de Gruyter, Berlin, New York.
- 16 **FC Sitzmann (Hrsg.)** (1995)
MLP Duale Reihe Pädiatrie, Hippokrates Verlag, Stuttgart.
- 17 **C v Schilling, C Günther, T Haferlach, C Ruelfs, T Lipp** (2003)
Myelodysplastische Syndrome
Manual Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome.
Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge.
Tumorzentrum München und W. Zuckerschwerdt Verlag München, 97-114.
- 18 Akute Myeloische Leukämien, Deutschland, 1980-2003
www.kinderkrebsregister.de
- 19 <http://www.kompetenznetz-leukaemie.de>
- 20 **H Van den Berghe, JJ Cassiman, G David, JP Fryns, JL Michaux, GM Sokal**
(1974)
Distinct haematological disorder with deletion of the long arm of no. 5 chromosome.
Nature, 251:437-437.
- 21 **AG Knudson, HW Hethcote, BW Brown** (1975)
Mutation and childhood cancer: a probabilistic model for the incidence of
retinoblastoma.
Proc Natl Acad Sci USA, 72: 5116-5120.
- 22 **R Marschalek, T Klingebiel** (2004)
Akute Hochrisiko Leukämie bei Kindern.
Forschung Frankfurt 2: 40-42.
- 23 <http://atlasgeneticsoncology.org>
- 24 **C Meyer, B Schneider, S Jakob, S Strehl, A Attarbaschi, S Schnittger, C Schoch,
MWJC Jansen, JJM van Dongen, ML den Boer, R Pieters, MG Ennas, E
Angelucci, U Koehl, J Graill, F Griesinger, U zur Stadt, C Eckert, T Szczepanski,
FK Niggli, BW Schäfer, H Kempinski, HJM Brady, J Zuna, J Trka, LL Nigro, A
Biondi, E Delabesse, E Macintyre, M Stanulla, M Schrappe, OA Haas, T
Burmeister, T Dingermann, T Klingebiel, R Marschalek** (2006)
The MLL recombinome of acute leukemias
Leukemia 20, 777-784.
- 25 **A Borkhardt, SE Bojesen, U Fuchs, OA Haas, D Bartelheimer** (2000)
The human GRAF gene is fused to MLL in a unique t(5;11)(q31;q23) and both alleles
are disrupted in three cases of myelodysplastic syndrome/ acute myeloid Leukemia
with a deletion 5q.
Proc Natl Acad Sci USA, 97: 9168-9173.
- 26 **JD Hildebrand, JM Taylor, JT Parson** (1996)
An SH3 domain-containing GTPase activating protein for Rho and Cdc42 associates
with focal adhesion kinase.
Mol Cell Biol, 16: 3169-3178.

-
- 27 **SE Bojesen, A Borkhardt** (2000)
GRAF (GPTase activating protein for Rho associated with FAK). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.
URL: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/GRAFID291.html>.
- 28 **S Karger** (1995)
ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Basel.
- 29 **SJ Collins, RC Gallo, RE Gallagher** (1977)
Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture.
Nature, 270: 347-349.
- 30 **WT Jr Dalton, MJ Ahearn, KB McCredie, EJ Freireich, SA Stass, JM Trujillo** (1988)
HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3.
Blood, 71: 242-247.
- 31 **B Lange, M Valtieri, D Santoli, D Caracciolo, F Mavilio, I Gemperlein, C Griffin, B Emanuel, J Finan, and P Nowell** (1987)
Growth factor requirements of childhood acute leukemia: establishment of GM-CSF-dependent cell lines.
Blood, 70: 192 - 199.
- 32 **AT Ichiki, CB Lozzio, EG Bamberger, PB Lucas, CJ Wust, JE Fuhr** (1987)
Continuous or modulation expression of hematopoietic cell antigens in sublines of the leukemia cell line, K-562.
Leuk Res, 11: 359-64.
- 33 **DK Lahiri, J Nurnberger** (1991)
A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood of RFLP studies.
Nucl Acids Res, 19: 5444.
- 34 **J Sambrook, EF Fritsch, and T Maniatis** (1989)
Molecular Cloning: A Laboratory Manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.
- 35 **P Chomczynski, N Sacchi** (1987)
Single-step method of RNA isolation by guanidium thiocyanate- phenol-chloroform extraction.
Anal Biochem, 162: 156-59.
- 36 **RK Saiki, DH Gelfand, S Stoffel, SJ Scharf, R Higuchi, GT Hom, KB Mullis, HA Erlich** (1988)
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science 239: 487-91.
- 37 **KB Mullis, F Faloona, SJ Scharf, RK Saiki, GT Horn, HA Erlich** (1986)
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction.
Quant Biol 51: 263-273.

-
- 38 **S Cheng, C Fockler, WM Barnes, R Higuchi** (1994)
Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA.
Proc Nat Acad Sci USA, 91: 5695-99.
- 39 **W Arber** (1974)
DNA Modification and Restriction.
Proc Nucl Acid Res Mol Bio, 14: 1-37.
- 40 **S Shuman** (1994)
Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase.
J Biol Chem, 269: 32678-32684.
- 41 **F Sanger, S Nicklen, and AR Coulson** (1977)
DNA sequencing with chain terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci USA, 74: 5463-67.
- 42 **S Fields, O Song** (1989)
A novel genetic system to detect protein-protein interactions.
Nature 340: 245-247.
- 43 **J Gyuris, E Golemis, H Chertkov, R Brent** (1993)
Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2.
Cell 75: 791-803.
- 44 **AR Mendelsohn, R Brent** (1994)
Biotechnology applications of interaction traps/ two hybrid system.
Curr Opinion on Biotechnol, 5: 482-486.
- 45 **Y Ebina, Y Takahara, F Kishi, A Nakazawa** (1983)
LexA protein is a repressor of the colicin E1 gene.
J Biol Chem, 258: 13258-13261.
- 46 **R Petermann, BM Mossier, DNT Aryee, H Kovar** (1998)
A recombination based method to rapidly assess specificity of two-hybrid clones in yeast.
Nucl Acids Res, 26: 2252-2253.
- 47 **E Ferrero, SM Goyert** (1988)
Nucleotide sequence of the gene encoding the monocyte differentiation antigen, CD 14.
Nucleic Acid Res, 16: 4173.
- 48 **A Haziot, S Chen, E Ferrero, MG Low, R Silber, SM Goyert** (1988)
The monocyte differentiation antigen, CD 14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage.
J Immunol, 141: 547-552.
- 49 **TD Bui, M Lako, S Lejeune, AR Curtis, T Strachan, S Lindsay, AL Harris** (1997)
Isolation of a full-length human WNT7A gene implicated in limb development and cell transformation, and mapping to chromosome 3p25.
Gene, 189: 25-29.

-
- 50 **S Ikegawa, Y Kumano, K Okui, T Fujiwara, E Takahashi, Y Nakamura** (1996)
Isolation, characterization and chromosomal assignment of the human WNT7A gene.
Cytogenet Cell Genet, 74: 149-152.
- 51 **T Nagase, K Ishikawa, N Miyajima, A Tanaka, H Kotani, N Nomura, O Ohara** (1998)
Prediction of the coding sequence of unidentified human genes. IX. The complete sequence of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro.
DNA Res, 5: 31-39.
- 52 **S Lev, H Moreno, R Martinez, P Canoll, E Peles, JM Musacchio, GD Plowman, B Rudy, J Schlessinger** (1995)
Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca^{2+} -induced regulation of ion channel and MAP kinase functions.
Nature, 376: 737-745.
- 53 **H Herzog, J Nicholl, YJ Hort, GR Sutherland, J Shine** (1996)
Molecular cloning and assignment of FAK2, a novel human focal adhesion kinase, to 8p11.2-p22 nonisotopic in situ hybridization.
Genomics, 32: 484-486.
- 54 **A Verreault, PD Kaufman, R Kobayashi, B Stillman** (1998)
Nucleosomal DNA regulates the core-histone-binding subunit of the human Hat1 acetyltransferase.
Curr Biol, 8: 96-108.
- 55 **P Wong, J Pineault, J Lakins, D Taillefer, J Leger, C Wang, M Tenniswood** (1993)
Genomic organization and expression of the rat TRPM-2 (clusterin) gene, a gene implicated in apoptosis.
J Biol Chem, 268: 5021-5031.
- 56 **P Wong, D Taillefer, J Lakins, J Pineault, G Chader, M Tenniswood** (1994)
Molecular characterization of the human TRPM-2/ clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration.
Eur J Biochem, 221: 917-925.
- 57 **EY Skolnik, B Margolis, M Mohammadi, E Lowenstein, R Fischer, A Drepps, A Ullrich, J Schlessinger** (1991)
Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/ cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases.
Cell, 65: 83-90.
- 58 **J Liang, JK Chen, ST Schreiber, J Clardy** (1996)
Crystal structure of PI3K SH3 domain at 20 angstroms resolution.
J Mol Biol, 257: 632-643.
- 59 **CS Hoffman, F Winston** (1987)
A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli.
Gene 57: 267-272.

-
- 60 **Yeast Protocol Handbook** (2001)
Clontech, Palo Alto, USA.
- 61 **JA Printen, GF Sprague** (1994)
Protein interactions in the yeast pheromone response pathway : Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade.
Genetics 138: 609-619.
- 62 **UK Laemmli** (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227: 680-685.
- 63 **H Towbin, T Staehelin, J Gordon** (1979)
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc Natl Acad Sci, 76 : 4350-4354.
- 64 **K Ogata, M Arakawa, T Kasahara, K Shiori-Nakano, K Hiraoka** (1983)
Detection of toxoplasma membrane antigens transferred from SDS-polyacrylamide gel to nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin-biotin, peroxidase anti peroxidase and immunoperoxidase methods.
J Immun Meth, 65: 75-82.
- 65 **Robbins J, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C** (1991)
Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence.
Cell, 64: 615-23.
- 66 **S Nikolaou, D Hartman, AJ Nisbet, PJA Presidente RB. Gasser** (2004)
Genomic organization and expression analysis for hcstk, a serine/threonine protein kinase gene of *Haemonchus contortus*, and comparison with *Caenorhabditis elegans* par-1.
Gene, 343: 313-322.
- 67 **R Marschalek, I Nilson, K Lochner, R Greim, G Siegler, J Greil, JD Beck, GH Fey** (1997)
The structure of the human ALL-1/MLL/HRX gene.
Leuk Lymphoma, 27: 417-28.
- 68 **International Human Genome Sequencing Consortium** (2001)
Initial sequencing and analysis of the human genome.
Nature 409, 860 – 921.
- 69 **L Cartegni, AR Krainer** (2003)
Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators.
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 11724, USA.
Nature structural biology, 10: 120-125.
- 70 **WA Hide, VN Babenko, PA van Heusden, C Seoighe, JF Kelso** (2001)
The contribution of exon-skipping events on chromosome 22 to protein coding diversity.
Genome Res, 11: 1848-53.

-
- 71 **E Miriami, H Margalit, R Sperling** (2003)
Conserved sequence elements associated with exon skipping.
Nucleic Acids Res, 1 : 1974–1983.
- 72 **W Park, JJ Choi, ES Hwang, JH Lee** (1996)
Identification of a variant estrogen receptor lacking exon 4 and its coexpression with wild-type estrogen receptor in ovarian carcinomas.
Clinical Cancer Research, 2: 2029-2035.
- 73 **H König** (2002)
Zwischen Genen, biologischer Komplexität und Krankheiten: Alternatives Spleißen von Botenmolekülen.
Nachrichten des Forschungszentrums Karlsruhe, Jahrgang 34, 26-30.
- 74 <http://us.expasy.org/prosite>, PDOC50003.
- 75 **SL Campbell, R Khosravi-Far, KL Rossman, GJ Clark, CJ Der** (1998)
Increasing complexity of Ras signaling.
Oncogene, 17: 1395-413.
- 76 **T Brinkmann** (2000)
Untersuchung der GAP-katalysierten GTP-Hydrolysereaktion von Ras und Rap.
Dissertation im Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- 77 **MF Olson, HF Paterson, CJ Marshall** (1998)
Signals from Ras and Rho GTPase interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1.
Nature, 394: 295-299.
- 78 <http://us.expasy.org/prosite>, PDOC50002.
- 79 **Z Weng, SM Thomas, RJ Rickles, JA Taylor, AW Brauer, C Seidel-Dugan, WM Michael, G Dreyfuss, JS Brugge** (1994)
Identification of Src, Fyn, and Lyn SH3-binding proteins: implications for a function of SH3 domains.
Mol Cell Biol, 7: 4509-4521.
- 80 **Z Weng, JA Taylor, CE Turner, JS Brugge, C Seidel-Dugan** (1993)
Detection of Src homology 3-binding proteins, including paxillin, in normal and v-Src-transformed Balb/c 3T3 cells.
J Biol Chem, 268: 14956 - 14963.
- 81 <http://us.expasy.org/prosite>, PDOC00262.
- 82 **AG Knudson** (1976)
Genetics and the etiology of childhood cancer.
Pediat Res, 10: 513-517.

Bei der Arbeit an meiner Promotion im onkogenetischen Forschungslabor der Kinderklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen haben mich viele Personen unterstützt.

In erster Linie möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Borkhardt für die umfassende Betreuung und unersetzliche Beratung bei der Entstehung meiner Doktorarbeit danken.

Vielen, vielen Dank auch an Frau Dr. Uta Fuchs und an Frau Claudia Keller, die mir alle hier angewendeten Methoden beigebracht haben und mir bei allen Problemen mit Rat und Tat und vor allem viel Geduld zur Seite standen.

Ganz besonderer Dank aber an Jörn, Maria, Kurt, Jana, Anne und Daniel ohne deren fachlicher und moralischer Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.