



**Melanomspezifische Genexpression  
und Signaltransduktion bei  
*Xiphophorus*: Die Rolle des  
Transkriptionsfaktors Mitf**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Jacqueline Delfgaauw**

aus

Baden-Baden

Würzburg im Januar 2003





Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. M. Scharl

Gutachter: Prof. Dr. G. Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meinen Eltern



„ La gravitation de l'esprit nous  
fait tomber vers le haut. “

(Die Schwerkraft des Geistes läßt

uns nach oben fallen.)

Simone Weil (1909-43), frz.

Philosophin



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Krebsentstehung und Transkriptionsregulation .....	1
1.2	<i>Xiphophorus</i> als Modellsystem für molekulare Tumorgenetik .....	4
1.3	Der Transkriptionsfaktor Mitf .....	10
1.4	Zielsetzung.....	13
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>14</b>
2.1	Zelllinien.....	14
2.2	Bakterien.....	14
2.3	Vektoren.....	15
2.4	Oligonukleotide.....	15
2.5	Enzyme und Enzymkits.....	16
2.6	Antikörper.....	16
2.7	Chemikalien und Radiochemikalien.....	17
2.8	Medien und Pufferlösungen.....	18
2.9	Geräte.....	18
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>20</b>
3.1	DNA-Klonierungstechniken.....	20
3.1.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> .....	20
3.1.2	PCR (polymerase chain reaction).....	21
3.1.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	21
3.1.4	Auffüllen überhängender 5´-Enden mit Klenow-Polymerase.....	22
3.1.5	Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	22
3.1.6	Phosphorylierung von DNA-Enden.....	22
3.1.7	Ligation von DNA.....	23

## Inhaltsverzeichnis

---

3.1.8	Transformation kompetenter Bakterien.....	23
3.1.9	Klonierungen.....	25
3.1.9.1	Klonierung verschiedener LUC+ Reporter-gen-Konstrukte.....	25
3.1.9.2	Klonierung eines XMitf-M Expressionsplasmids.....	27
3.2	DNA-Gelelektrophorese.....	28
3.2.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	28
3.2.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	29
3.2.3	Isolierung von DNA-Fragmenten.....	29
3.3	Radioaktive Markierung von DNA.....	30
3.3.1	3'-Endmarkierung.....	30
3.3.2	Primer-Endlabelling.....	30
3.4	RACE-Experimente (Rapid amplification of cDNA ends).....	30
3.4.1	3'RACE.....	30
3.4.2	5'RACE.....	31
3.5	Sequenzanalyse von DNA.....	32
3.6	Zellkultur und Zellaufschlußverfahren.....	32
3.6.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen.....	32
3.6.2	DNA-Transfer in eukaryontische Zellen mittels Kalzium-Phosphat-Methode.....	33
3.6.3	Aufschluß eukaryontischer Zellen.....	34
3.6.4	Luciferase-Aktivitätsbestimmung nach DNA-Transfer.....	35
3.7	Analyse von Proteinen.....	36
3.7.1	Proteinbestimmung.....	36
3.7.2	Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	36
3.7.3	Western-Blot-Analyse.....	37
3.8	DNA-Protein-Bindungsstudien.....	39

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung des Transkriptionsfaktors Mitf....</b>	<b>40</b>
4.1.1	Sequenzanalysen.....	40
4.1.1.1	Vergleichende Charakterisierung von XMitf-B und XMitf-M.....	41
4.1.1.2	Sequenzanalysen im Vergleich mit anderen Spezies und Charakterisierung des evolutionären Ursprungs der Gene.....	45
4.1.2	Charakterisierung von XMitf-M.....	48
4.1.2.1	Analyse von XMitf-M nach transienter Expression in <i>Xiphophorus</i> Melanomzellen.....	48
4.1.2.2	Analyse von XMitf-M nach transienter Expression in Säugerzellen.....	49
<b>4.2</b>	<b>Untersuchungen zur melanomspezifischen Trans- kriptionsaktivierung in <i>Xiphophorus</i>.....</b>	<b>52</b>
4.2.1	Identifizierung melanomspezifischer <i>cis</i> -regulatorischer Bereiche im Tyrosinasepromotor von Medaka ( <i>Oryzias latipes</i> )..	52
4.2.2	Analyse potentieller Bindungsstellen für Mitf.....	54
4.2.2.1	Nachweis von DNA/Protein Komplexen mittels EMSA.....	54
4.2.2.2	Funktion der Mitf-Bindungsstellen im Medaka Tyrosinasepro- motor für die melanomspezifische Transkriptionsaktivierung.....	56
4.2.3	Einfluß des Transkriptionsfaktors Mitf-M auf den Medaka Tyrosinasegenpromotor.....	60
4.2.3.1	Coexpression des Tyrosinasepromotors und XMitf-M in <i>Xiphophorus</i> Fibroblasten.....	60
4.2.3.2	Coexpression des Tyrosinasepromotors und XMitf-M in Säugerzellen.....	62
4.2.4	Untersuchungen zur Rolle von Mitf in der Signaltransduktion.....	63

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
5.1	Evolution der <i>mitf</i> Gene.....	65
5.2	Untersuchungen zur melanomspezifischen Transkriptionsaktivierung in <i>Xiphophorus</i> .....	68
5.2.1	Spezifische Aktivierung des Tyrosinasepromoters von Medaka in Melanomzellen.....	68
5.2.2	Die Rolle von Mitf in melanomspezifischer Transkriptionsaktivierung.....	72
5.3	Mitf als wichtiges regulatorisches Element in der Signalkaskade.....	74
<b>6</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b><u>Summary</u></b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b><u>Abkürzungen</u></b>	<b>81</b>
<b>9</b>	<b><u>Literatur</u></b>	<b>84</b>
<b>10</b>	<b><u>Publikationen</u></b>	<b>95</b>
<b>11</b>	<b><u>Danke!</u></b>	<b>96</b>
<b>12</b>	<b><u>Lebenslauf</u></b>	<b>97</b>
<b>13</b>	<b><u>Eidesstattliche Erklärung</u></b>	<b>98</b>

## **1 Einleitung**

### **1.1 Krebsentstehung und Transkriptionsregulation**

Eine Grundlage der molekularen Krebsforschung, nämlich die Erkenntnis, dass Krebs eine genetische Krankheit ist, geht bereits auf Beobachtungen des Würzburger Zoologen Theodor Boveri zu Anfang des letzten Jahrhunderts zurück. Boveri formulierte 1914 in seinem Werk "Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren" die Vorstellung, dass Krebs ein zelluläres Problem sei (Boveri, 1914). Dabei postulierte er unter anderem, dass die Tumorentstehung eine progressive Abfolge genetischer Ereignisse in einem einzigen Zellklon ist. Heute wissen wir, dass die Tumorentstehung zurückgeht auf die strukturelle oder regulatorische Veränderung von Genen, deren Produkte entscheidend an der Kontrolle von Proliferations- und Differenzierungsprozessen beteiligt sind. Die meisten Zellen eines mehrzelligen Organismus besitzen den gleichen Bestand an DNA. Differenzierungs- und Proliferationsprozesse beruhen demnach auf Änderungen im genetischen Programm, d.h. der spezifischen Aktivierung oder Repression der Aktivität bestimmter Gene.

Die Initiationsrate der Transkription ist einer der wichtigsten Punkte, an dem die Genaktivität reguliert wird. Sie wird von einem der Zelle eigenen genetischen Programm gesteuert, aber auch von extrazellulären Signalen beeinflusst. Für das korrekte Funktionieren bzw. einen normalen Phänotyp einer Zelle ist eine exakte Koordination und Kontrolle der Transkription vieler Gene unerlässlich.

An der Regulation des zellulären Transkriptionsprogramms sind die Genprodukte sowohl der meisten Proto-Onkogene, wie der Tumorsuppressorgene beteiligt. Ihre Beteiligung erfolgt entweder direkt oder indirekt über Signaltransduktionswege. Deshalb können Mutationen in diesen Genen, die zur Entstehung von Onkogenen oder zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen, in unkontrolliertem Wachstum der Zellen und letztendlich in Tumoren resultieren.

### Regulatorische Elemente und Transkriptionsfaktoren

Es gibt drei DNA-abhängige RNA-Polymerasen, die für die Transkription benötigt werden. Dies sind die RNA-Polymerasen I und III, die rRNA und tRNA synthetisieren und in allen eukaryontischen Zellen im Translationsprozeß erforderlich sind, sowie die RNA-Polymerase II, die die proteinkodierenden Gene transkribiert, deren Produkte wiederum den zellulären Phänotyp bestimmen. Der Multienzymkomplex RNA-Polymerase II selbst zeigt keine sequenzspezifischen Interaktionen mit DNA, sondern benötigt akzessorische Proteine, die sogenannten basalen Transkriptionsfaktoren (Drapkin et al., 1993; Orphanides et al., 1996), um an definierten Stellen des Genoms, den Transkriptionsstartstellen, mit der Transkription zu beginnen. Den DNA-Abschnitt, der für die Anlagerung dieser Faktoren notwendig ist, bezeichnet man als basalen Promotor eines Gens. Aufgrund von Sequenzvergleichen wurde eine hochkonservierte Nukleotidsequenz, die sog. TATA-Box, deren Funktion in der korrekten Positionierung der RNA-Polymerase besteht, gefunden (Bucher, 1990). An diese bindet der einzige basale Transkriptionsfaktor, der eine sequenzspezifische DNA-Bindung aufweist, das TATA-Box bindende Protein TBP. Interessanterweise hat dieses Protein auch eine Funktion in der Transkription von Genen, die von Polymerase I und Polymerase III transkribiert werden (Sharp, 1992; Hernandez, 1993). Das TATA-Box bindende Protein TBP stellt somit einen universellen eukaryontischen Transkriptionsfaktor dar. Nachdem TBP an die TATA-Box gebunden hat, lagern sich nach und nach die anderen basalen Transkriptionsfaktoren, sowie die RNA-Polymerase II an. Es kommt zum Aufbau eines produktiven Transkriptions-Initiationskomplexes (Zawel und Reinberg, 1992; Roeder, 1996; Tang et al., 1996).

Außer der TATA-Box existiert ein weiteres DNA-Element, welches eine akkurate Transkriptionsinitiation gewährleistet. Dieser sogenannte Initiator liegt im Bereich des Transkriptionsstarts. In vielen zellulären und viralen Promotoren findet man sowohl eine TATA-Box, wie auch einen Initiator. In diesen Fällen kommt es zur simultanen Interaktion von Initiatorbindenden Proteinen und TBP mit der DNA (Novina und Roy, 1996). Die

transkriptionelle Aktivität eines Basalpromotors kann durch weitere *cis*-ständige DNA-Elemente, die in der Nähe, aber auch sehr weit entfernt vom Promotor liegen können (Ptashne, 1986), beeinflusst werden. Sie können die Transkriptionsrate sowohl erhöhen wie erniedrigen. Meist ist die Funktion derartiger DNA-Elemente unabhängig von ihrer Orientierung und Position relativ zum Promotor. Sie werden als "enhancer" bezeichnet, wenn es sich um transkriptionsverstärkende, als "silencer", wenn es sich um transkriptionsreprimierende Elemente handelt (Serfling et al., 1985; Renkawitz, 1990). Durch die Kombination aller regulatorischer Elemente werden Gewebesowie stadienspezifische Expressionsmuster von Genen festgelegt (Struhl, 1991).

Spezifische DNA-Elemente steuern ebenfalls die Änderung der Transkriptionsrate von Genen als Antwort auf extrazelluläre Signale (Hill und Treisman, 1995). Die Repression der Transkription kann über verschiedene Mechanismen erfolgen (Renkawitz, 1990), z.B. indem ein Repressor mit der DNA-Bindung eines Aktivatorproteins interferiert. Das kann über direkte Konkurrenz um das gleiche DNA-Element, aber auch über die Störung der lokalen DNA-Struktur erfolgen. Mittlerweile sind einige Beispiele beschrieben worden, in denen ein Aktivatorprotein auch als Repressor fungieren kann. Die Änderung der Funktion von einem Aktivator hin zu einem Repressorprotein kann einerseits vom Sequenzkontext, in dem sich die Bindungsstelle für das entsprechende Protein befindet, abhängig sein, aber auch von der Konzentration des Transkriptionsfaktors oder von der Bindung eines Liganden (Roberts und Green, 1995) .

Die Regulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren, die wichtig ist um differentielle Genexpression während Wachstums- und Differenzierungsprozessen zu gewährleisten, kann auf zwei Ebenen, nämlich über die Konzentration oder über die Aktivität der Transkriptionsfaktoren erfolgen (Calkhoven und Ab, 1996). Die Konzentration von Transkriptionsfaktoren kann über ihre Synthese, d.h. also auf allen Schritten von der Transkription bis zur Translation gesteuert werden. Die Konzentration wird aber ebenfalls über den Abbau, sowie durch die Freisetzung dieser Proteine aus inaktiven Komplexen oder über den Transport in den Zellkern reguliert (Vandromme et

al., 1996). Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wird über Ligandenbindung (Mangelsdorf et al., 1995) reguliert, durch proteolytische Aktivierung (Pahl und Baeuerle, 1996), sowie über den Oxidationszustand des Proteins (Pognonec et al., 1992). Am häufigsten findet man eine kovalente Modifikation durch Phosphorylierung (Hill und Treisman, 1995). Hierbei erlaubt der reversible Charakter dieser Modifikation, bedingt durch die Anwesenheit von Proteinkinasen und -phosphatasen innerhalb der Zelle, die schnelle Regulation der Transkriptionsfaktoraktivität (Schonthal, 1995).

## **1.2 *Xiphophorus* als Modellsystem für molekulare Tumorgenetik**

### Tiermodelle für die Krebsentstehung

Kultivierte Zellen sind, da sie unter genau kontrollierten Bedingungen gehalten werden können, ideal um eine biochemische Charakterisierung von Onkoproteinen oder den Produkten der Tumorsuppressorgene durchzuführen. Immortalisierte Zelllinien sind allerdings nicht immer dazu geeignet, das komplexe Zusammenspiel verschiedener Gene und der von ihnen kodierten Proteine zu untersuchen, da auch sie sich von normalen Körperzellen unterscheiden. Zudem spielen bei der Krebsentstehung häufig die Interaktionen der neoplastischen Zellen mit nicht transformierten Zellen in ihrer Umgebung eine wichtige Rolle. Da sich dieses Phänomen in einer Zellkultur nur schwer oder gar nicht simulieren läßt, spielen Tiermodelle eine wichtige Rolle in der experimentellen Krebsforschung.

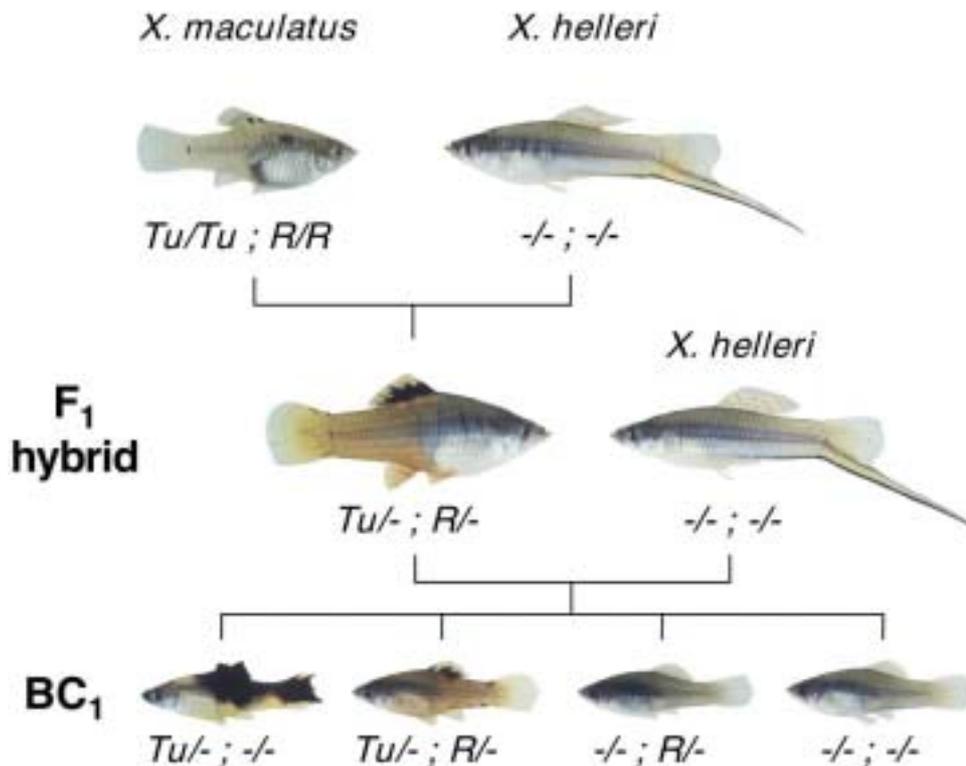
### *Xiphophorus* als Modellsystem für molekulare Tumorgenetik

Ein genetisch gut charakterisiertes und verstandenes System, um die molekularen Zusammenhänge und Mechanismen der Tumorentstehung zu untersuchen, stellt die erbliche Melanomentstehung bei Zahnkarpfen der Gattung *Xiphophorus* dar (Friend, 1993). Diese Fische gehören zur Familie der lebendgebärenden Zahnkarpfen (Poeciliidae), von denen bisher 23 verschiedene Arten, die in den Flußsystemen Mexikos und Zentralamerikas beheimatet sind, beschrieben wurden (Kallmann, 1975; Meyer et al., 1994). Aufgrund ihrer vielfältigen Pigmentierungs-muster und ihrer einfachen

Haltung sind sie seit langer Zeit beliebte Zierfische bei Aquarianern. Die einzelnen Arten sind untereinander kreuzbar und produzieren fertile Nachkommen. Bereits Anfang des letzten Jahrhunderts konnten bei Kreuzungen bestimmter *Xiphophorus*-Arten krebsartige Wucherungen festgestellt werden und in den 20er Jahren beschrieben einige Forscher unabhängig voneinander (Gordon, 1927; Häussler, 1928; Kosswig, 1928) das spontane Auftreten von Melanomen in bestimmten Hybriden, die aus Kreuzungen von Platyfischen (*Xiphophorus maculatus*) und Schwerträgern (*Xiphophorus helleri*) hervorgehen. Diese Tumore entstehen aus intensiv gefärbten Pigmentzellen in der Haut, den sogenannten Makromelanophoren. Diese Zellen werden deshalb Makromelanophoren genannt, da sie um ein Vielfaches größer sind als die regulären Mikromelanophoren, welche für die einheitlich graue Grundfärbung des Körpers verantwortlich sind (Gordon, 1927).

Relativ bald nach der ersten Beschreibung der Melanome konnte gezeigt werden, dass ihr Auftreten auf einen einzigen dominanten Genlocus auf den Geschlechtschromosomen des Platys zurückzuführen ist (Kosswig, 1929). Dieser Locus, der später von Ahuja und Anders (Ahuja und Anders, 1976) mit *Tu* (Tumorlocus) bezeichnet wurde, tritt mit dem Genom des Schwerträgers in "Interaktion" (Kosswig, 1929). 1976 wurde ebenfalls von Ahuja und Anders ein Modell zur Melanomentstehung in *Xiphophorus*hybriden aufgestellt, in dem modifizierende Genloci (hier als regulatorische Loci *R* bezeichnet) dem Genom von *X.maculatus* zugeschrieben wurden und somit als Suppressoren der Aktivität des Tumorlocus *Tu* wirken. Die Gene der Loci *Tu* und *R* entsprechen damit den genetischen Definitionen von dominanten Onkogenen und Tumorsuppressorgenen.

Abbildung 1: Das Kreuzungsschema von *Xiphophorus* (Erläuterungen im Text)



Bei der Kreuzung eines makromelanophorentragenden Platyweibchens (*X. maculatus*) mit einem Schwerträgermännchen (*X. helleri*) kommt es in den Hybriden der Filialgeneration (F<sub>1</sub>-Hybrid) zu einer Vergrößerung des von den Makromelanophoren gebildeten Pigmentflecks in der Rückenflosse bis hin zum Auftreten von benignen Melanomen. Die Rückkreuzung der F<sub>1</sub>-Hybridindividuen mit Schwerträgern resultiert dann in der ersten Rückkreuzungsgeneration (BC<sub>1</sub>) zu 50% in gesunden Fischen ohne Makromelanophoren, zu 25% gleichen die Nachkommen phänotypisch den F<sub>1</sub>-Hybriden und 25% der Fische entwickeln maligne Melanome, bei denen die Melanomzellen invasiv in das umgebende Gewebe einwachsen. Dabei

liegt ein dihybrider Erbgang zugrunde, bei dem zwei unabhängig segregierende Loci das Auftreten und den Malignitätsgrad der Melanome steuern. Der geschlechtschromosomale *Tu*-Locus von *X.maculatus* enthält ein Gen, das ursächlich für die Melanomentstehung verantwortlich ist. Es handelt sich hierbei um ein dominantes Onkogen, d.h. es kommt schon beim Vorhandensein von nur einer Kopie zur Tumorentstehung. Der autosomale Locus *R* dagegen enthält nach der Suppressor-Hypothese ein oder mehrere Gene, die als negative Regulatoren von *Tu* wirken. Der Wegfall einer Kopie für den *Tu* Locus führt in den F<sub>1</sub>-Hybriden zur Ausbildung von benignen Melanomen. Die kreuzungs-bedingte Eliminierung der zweiten Kopie in 25% der Rückkreuzungstiere führt dann zur Entstehung der malignen Hauttumoren.

Ein zweites Modell zur Erklärung der beobachteten Phänotypen ist das Aktivator-Modell, welches postuliert, dass *R* ein Bestandteil des *X.helleri* Genoms ist und den Tumorlocus in den Hybriden aktiviert. Nur das Vorhandensein beider Kopien von *R* resultiert in malignen Melanomen, da nur der Gendosis-Effekt zur vollständigen Aktivierung von *Tu* führt (Ahuja und Anders, 1976).

Die Prädisposition zur Melanombildung nach Kreuzung beschränkt sich nicht auf *X.maculatus*, sondern findet sich auch in anderen Spezies der Gattung *Xiphophorus*, wie z.B. *X.cortezii*, *X.variatus* und *X.xiphidium* (Schartl, 1990; Weis und Schartl, 1998).

### Die Xmrk Rezeptortyrosinkinase

Anhand des mittels einer Positions-Klonierungsstrategie klonierten Onkogens von *Xiphophorus* konnte im Falle des *Tu*-Locus eine cDNA isoliert werden, die für eine Rezeptortyrosinkinase kodiert. Das aus der Nukleinsäuresequenz vorhergesagte Protein von 1164 Aminosäuren weist hohe Homologie zu dem menschlichen Rezeptor für den Wachstumsfaktor EGF (epidermal growth factor) auf. Das Protein stellt die onkogene Version des egfr-b von *Xiphophorus* dar (Volf und Schartl, im Druck) und wurde Xmrk (*Xiphophorus* melanoma receptor kinase) genannt (Wittbrodt et al., 1989a). In zwei spontan auftretenden Mutanten, wobei in der einen ein großer Teil des *Xmrk*-Gens

deletiert ist und in der anderen eine Insertion eines 7 kb-Fragments in einem Exon stattfand (Wittbrodt et al., 1989a), ist die Prädisposition zur Melanomentstehung nach Kreuzung verloren gegangen. Dadurch konnte bewiesen werden dass tatsächlich *Xmrk* das tumorauslösende Gen ist. Experimente, in denen das *Xmrk*-Onkogen in Embryonen des Medakafisches (*Oryzias latipes*) zur Überexpression gebracht wurde (Winkler et al., 1994), konnten den Nachweis erbringen, dass das vom *Xmrk*-Onkogen kodierte Protein als alleiniger Auslöser für die Tumorentstehung fungieren kann. In diesen transient transgenen Embryonen konnte das gehäufte Auftreten von Tumoren in verschiedenen Organen beobachtet werden. Gegen die Beteiligung zusätzlicher Ereignisse, wie z.B. der Aktivierung bestimmter Wirtsgene oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, spricht die kurze Latenzzeit bis zum Auftreten der Tumore.

Die Rückkreuzung melanomtragender Hybridfische mit *Platys* (*X.maculatus*) resultiert in einer gesunden Nachkommengeneration (Anders et al., 1984). Dies zeigt, dass das *Xmrk*-Gen im Verlauf der Kreuzungen, nach denen es zu Melanomentstehungen gekommen ist, strukturell nicht verändert wurde.

Es gibt zwei verschiedene Genkopien von *Xmrk* (Wittbrodt et al., 1989b), wobei die eine, die onkogene Form *ONC*, mit dem *Tu*-Locus und somit mit der Prädisposition zur Melanomentstehung assoziiert ist. Die andere Genkopie von *Xmrk* tritt invariant in allen bisher untersuchten Arten von *Xiphophorus* und auch in anderen Gattungen der Familie *Poeciliidae*, sowie beim Kugelfisch *Fugu* auf. Sie wurde daher *INV* genannt und stellt das korrespondierende Proto-Onkogen zu *ONC* dar, entspricht daher *Xegfr-b*. Im Gegensatz zu *ONC* hat die Genkopie *INV* keine Assoziation zur Melanomentstehung.

Membranständige Rezeptortyrosinkinasen, wie *Xmrk*, dimerisieren nach der Bindung eines Liganden. Diese Dimerisierung führt zu einer *trans*-Autophosphorylierung an intrazellulären Tyrosinresten, was es dem derart modifizierten Rezeptor dann ermöglicht mit einer Reihe von Substraten zu interagieren und damit verschiedene intrazelluläre Signalübertragungskaskaden auszulösen (Ullrich und Schlessinger, 1990; Heldin, 1995). Bis heute konnte noch kein Ligand für *Xmrk* identifiziert werden, aber

es sind einige intrazelluläre Proteine bekannt, die mit dem Rezeptor in Wechselwirkung treten und auch von diesem phosphoryliert oder zumindest aktiviert werden. Zu diesen Faktoren zählen die zytoplasmatische Tyrosinkinase Fyn (Wellbrock et al., 1995), der Transkriptionsfaktor Stat5 (Baudler et al., 1997; Wellbrock et al., 1997), oder auch die MAP(mitogen-activated protein)kinasekinase (MEK) und die MAPK selbst (Wellbrock und Schartl, 1999).

Untersuchungen an Melanomgewebe aus *Xiphophorus* ergaben, daß *Xmrk* in diesen Zellen konstitutiv aktiv ist, und das mengenmäßig häufigste tyrosinphosphorylierte Protein darstellt. In anderen Geweben dagegen ist es auch in seiner nicht-phosphorylierten Form nicht nachweisbar (Malitschek et al., 1994). Aus den genetischen Daten, die durch die biochemischen Beobachtungen unterstützt werden, läßt sich folgern, dass das *Xmrk*-Protein ursächlich an der Transformation der Pigmentzellen beteiligt ist.

Nur wenn mindestens zwei genetische Veränderungen vorliegen kommt es zu erblich bedingter Melanomentstehung. Außer dem Vorhandensein des Onkogens muß gegeben sein, dass der *R*-Locus entweder eliminiert oder im anderen Fall durch die Kreuzung eingebracht worden ist. Dieser regulatorische Locus wirkt modulierend auf den *Tu*-Locus und scheint direkt oder indirekt in die Transkriptionskontrolle einzugreifen. Es wäre also möglich dass es sich bei dem Genprodukt des *R*-Locus um einen Transkriptionsfaktor oder ein Signaltransduktionsmolekül handelt, das wiederum modulierend auf ein solches DNA-Bindeprotein einwirkt. In diesem Falle würde die Kenntnis der Komponenten und Mechanismen, die an der Überexpression des *Xmrk*-Onkogens in Melanomen beteiligt sind, wichtig sein, um die Identität des regulatorischen Locus *R* aufzudecken, und dazu beitragen, melanom-spezifische Transkriptionsregulation zu verstehen.

#### Aktivierung im Zellkern: MAPkinase Signalwege

Eine Signaltransduktionskaskade, die unter anderem durch die Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen wie dem *Xmrk* Rezeptor oder dem menschlichen EGF Rezeptor ausgelöst werden kann, ist der MAPkinase (mitogen-activated protein kinase) Signalweg (Marshall, 1994; Leervers et al., 1994). Über die

Signalmoleküle Ras und Raf kommt es hier durch eine Phosphorylierungskaskade zur Aktivierung von MAPKs wie ERK1 und ERK2 (extracellular signal-regulated kinase), die ihrerseits in den Zellkern migrieren und dort die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren beeinflussen (Avruch et al., 1994). Eine Reihe von Proteinen konnte bislang als Zielproteine dieses Ras/ERK Signalweges identifiziert werden, darunter die Ternär-Komplex Faktoren (TCF) Elk-1 und SAP-1, sowie das Ets-Protein PEA3 (Marais et al., 1993; O'Hagan et al., 1996). Daneben wurde noch ein weiterer MAPK-Signalweg beschrieben, der sowohl an der Regulation von Ets-Transkriptionsfaktoren wie auch des c-Jun Proteins beteiligt ist. Die Regulation erfolgt hier über die MAPKinasen JNK und SAPK (für Jun N-terminal/stress activated protein-kinases), die wie ERKs durch extrazelluläre Signale aktiviert werden und durch Phosphorylierung die DNA-Bindung bzw. die transkriptionelle Aktivität korrespondierender Faktoren beeinflussen (Davis, 1994; Kyriakis et al., 1994). Das Verstehen dieser komplexen Zusammenhänge in der Signalweiterleitung ist notwendig für das Verständnis melanomspezifischer Transkription.

### **1.3 Der Transkriptionsfaktor Mitf**

Einer der Transkriptionsfaktoren, die durch MAPkinase Erk reguliert werden, ist der "Microphthalmia associated transcription factor", abgekürzt Mitf (Hemesath et al., 2000). Transkriptionsfaktoren sind nukleäre Proteine, die mit spezifischen DNA-Elementen interagieren und so die Transkription eines in *cis*-Position lokalisierten Zielgens regulieren. Transkriptionsfaktoren sind dabei in der Lage, ein vollständiges Programm zur Differenzierung einer Zelle zu initiieren und aufrecht zu erhalten, indem sie einen bestimmten Satz von Zielgenen mit der korrespondierenden DNA-Erkennungssequenz transkriptionell beeinflussen. Vor einigen Jahren wurde entdeckt dass der Transkriptionsfaktor Mitf, der zu der evolutionsbiologisch „alten“ Familie der b-HLH-LZ Proteine gehört (Atchley und Fitch, 1997), eine wichtige Rolle in der Differenzierung verschiedener Zelltypen zu spielen scheint. Zu diesen Zellarten zählen Melanozyten, Pigmentzellen der Retina ("optic cup-derived retinal pigment epithelium (RPE)"), Mastzellen und Osteoclasten

(Hodgkinson et al., 1993; Yasumoto et al., 2002). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass Mutationen im murinen *mi* Locus Auswirkungen auf Melanozyten und in einigen Fällen auch auf andere Zelltypen wie die Pigmentzellen der Retina haben (Ferguson und Kidson, 1997). Bei der Maus resultieren die stärksten Mutationen im *mi* Locus in Tieren, die als "microphthalmic" bezeichnet werden, d.h. sie sind in ihrer anatomischen Größe reduziert, ihre Augen sind nur gering entwickelt, sie sind taub aufgrund des Fehlens von Melanozyten im inneren Ohr und haben ein unpigmentiertes Fell. Zusätzlich haben diese Tieren einen Mangel an Mastzellen und besitzen defekte Osteoclasten (Ferguson und Kidson, 1997). Im menschlichen *mitf* Gen gehen Mutationen einher mit dominant vererbten Syndromen, welche sich durch den sensorischen Verlust des Hörens und in abnormaler Pigmentierung von Haut und Haaren manifestieren (Tassabehji et al., 1994; Nobukuni et al., 1996; Amiel et al., 1998; Yasumoto et al., 2002). Diese mit den Mutationen von hMITF assoziierten pathologischen Phänomene werden unter dem Waardenburg Syndrom Typ 2 zusammengefasst (Hughes et al., 1994).

Die biochemische Funktion des Transkriptionsfaktors läßt sich durch seine Interaktion mit dem gewebespezifischen Gen Tyrosinase erklären (Ferguson und Kidson, 1997). Diese Zusammenhänge werden im Folgenden näher erläutert.

In Vertebraten läuft die Melanogenese in Melanozyten nach Differenzierung der nicht-pigmentierten Vorläuferzellen, den Melanoblasten, ab (Bertolotto et al., 1998). An diesem enzymatischen Prozeß, in dem Tyrosin zu Melanin-Pigmenten wird, sind drei melanozyten-spezifischen Enzyme, nämlich Tyrosinase (Hearing, 1987; Prota, 1988), TRP1 (tyrosinase-related protein 1) (Kobayashi et al., 1994) und TRP2 (tyrosinase-related protein 2) (Jackson et al., 1992; Yokoyama et al., 1994) beteiligt. Die Expression dieser Enzyme ist auf Melanozyten beschränkt, d.h. die Promotoren scheinen Regulations-elemente zu besitzen, die verantwortlich für eine gewebespezifische Expression sind (Bertolotto et al., 1998). Sequenzierungen und vergleichende Sequenzstudien der Promotoren von Tyrosinase, TRP1 und TRP2 ließen ein hochkonserviertes zehn Basenpaar langes Motiv

(GTCATGTGCT) finden. Diese Sequenz, die sogenannte M-Box, scheint eine wichtige Rolle in der Expression der Tyrosinase- und der TRP1-Gene zu spielen (Ganss et al. 1994; Yokoyama et al. 1994). Das Kernmotiv der M-Box (CATGTG) ähnelt der Sequenz CANNTG (E-Box), an die b-HLH Transkriptionsfaktoren binden (Bertolotto et al., 1998). Die Leuzinzipper-Region ermöglicht diesen Proteinen sowohl Homodimere wie auch Heterodimere zu formen (Yasumoto et al., 2002). Für den "Microphthalmia associated transcription factor" (Mitf) konnte nachgewiesen werden, dass er an die M-Box bindet (Ferguson und Kidson, 1997) und somit assoziiert ist mit einer gewebespezifischen Expression dieser an der Melanogenese beteiligten Enzyme.

Der Transkriptionsfaktor Mitf weist eine signifikante Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz, vor allem im b-HLH-Leuzinzipper-Bereich mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie TFE 3, TFEB und TFEC auf (Beckmann et al. 1990; Carr und Sharp, 1990; Yasumoto und Shibahara, 1997), was auf eine Zugehörigkeit zur gleichen Genfamilie hinweist.

Das Protein Mitf (microphthalmia associated transcription factor) kommt in Säugetieren in mindestens sieben Isoformen vor, Mitf-M, -H, -A, -B, -C, -D und -E (Amae et al., 1998a; Mochii et al., 1998; Fuse et al., 1999; Uono et al., 2000a; Saito et al., 2002). Die verschiedenen Isoformen haben funktionelle Eigenschaften, wie eine allgemeine transkriptionelle Aktivierung, aber auch strukturelle Domänen, so beispielsweise die b-HLH-Leuzinzipper-Region, gemeinsam. Sie unterscheiden sich jedoch in ihren Amino-Termini (Goding, 2000). Diese Isoform-spezifischen Amino-Termini werden durch unterschiedliche Exon 1 des *mitf* Gens kodiert und durch differentielles Spleißen exprimiert (Yasumoto et al., 1998; Uono et al., 2000b). Im Gegensatz zu den anderen Isoformen wird die M-Isoform (Mitf-M) bei Säugern spezifisch in Melanozyten und Melanomzellen exprimiert (Amae et al., 1998b). Mitf-M wird mittels des melanozytenspezifischen Promotors (*M* Promotor) reguliert (Fuse et al., 1996) und transaktiviert in kultivierten Zellen die Gene der an der Melanogenese beteiligten Enzyme, wie Tyrosinase und Tyrosinase-verwandtes Protein 1 (TRP-1). Dies geschieht über ein *cis*

regulierendes DNA Element, das ein CATGTG Motiv enthält (Goding, 2000; Yasumoto et al., 2002).

#### **1.4 Zielsetzung**

Die transkriptionelle Kontrolle der Genexpression nimmt eine Schlüsselrolle bei vielen homöostatischen Zellprozessen wie der Regulation von Zellteilung, Differenzierung oder Apoptose ein. Die primären Mediatoren auf dieser Ebene der Genregulation sind Transkriptionsfaktoren. Die Kenntnis der Mechanismen der Transkriptionsregulation in normalen und transformierten Zellen stellt daher eine wichtige biochemische Grundlage für das Verständnis der molekularen Ereignisse, die der Krebsentstehung zugrunde liegen, dar. Durch Untersuchungen des an der Melanogenese beteiligten Tyrosinasegens, welches einen wichtigen Differenzierungsmarker darstellt, sollten regulatorische Mechanismen seiner spezifischen transkriptionellen Aktivierung genauer geklärt werden. Da Mitf-M spezifisch in Melanozyten und Melanomzellen exprimiert wird, scheint es eine wichtige Rolle in der melanozyten- und/oder melanomspezifischen transkriptionellen Aktivierung zu spielen. Die Beteiligung von Mitf in der melanomspezifischen Signaltransduktion scheint dabei von besonderem Interesse zu sein.

Da das *Xiphophorus* Melanomsystem ein genetisch gut charakterisiertes Tiermodell darstellt, in dem die transkriptionelle Deregulation eines durch eine chromosomale Translokation entstandenen Onkogens vom zellulären Niveau bis hin zum gesamten Organismus untersucht werden kann, wurde dieses Fischsystem als Modellsystem herangezogen. Die Kenntnis der molekularen Mechanismen, die Folge der veränderten Transkriptionsregulation des tumor-auslösenden Gens *Xmrk* sind, kann einen wichtigen Beitrag zum Verständnis grundlegender Mechanismen in der Tumorentstehung bei Vertebraten leisten.

Ausgehend von dem im einleitenden Kapitel beschriebenen Wissensstand wurden verschiedene Teilaspekte der melanomspezifischen Genexpression in *Xiphophorus*, speziell die Rolle des Transkriptionsfaktors Mitf (microphthalmia associated transcription factor) untersucht.

## 2 Material

### 2.1 Zelllinien

A2: spontan immortalisierte Zelllinie aus Embryonen von *Xiphophorus xiphidium*, die aus nicht näher spezifizierten epitheloiden Zellen besteht (Kuhn et al., 1979)

PSM: (Platy-Swordtail-Melanoma): die Zellen leiten sich aus dem amelanotischen Anteil eines spontanen Melanoms von *Xiphophorus*-Hybriden ab (Wakamatsu et al., 1981; Wakamatsu et al., 1984) und tragen ein *Xiphophorus* Y-Chromosom mit *Tu*-Locus (Mäueler et al., 1988)

293 T: etablierte Linie humaner embryonaler Nierenfibroblasten (ATCC#CRL1573)

BHK Hm: BHK 21 Hamsterzelllinie, stabil transfiziert mit dem Expressionskonstrukt CVN-HER/mrk (Wittbrodt et al., 1992; von Dr. R. Lammers, Martinsried). In dieser Arbeit wurde der Klon BHK Hm9 verwendet.

NIH 3T3 Hm: Maus-Fibroblastenzelllinie, stabil transfiziert mit dem Expressionskonstrukt CVN-HER/mrk (Wittbrodt et al., 1992)

### 2.2 Bakterien

*E.coli* XL1 Blue: endA1, hsdR17(rk-, mk+), supE44, thi-,  $\lambda$ -, recA1, gyrA96, relA1,  $\Delta$ (lac), [F<sup>-</sup>, proAB, lacIq $\Delta$ M15, Tn10(tetR)]

*E.coli* DH5 $\alpha$ : F-, endA1, hsdR17(rk-, mk+), supE44, thi-1,  $\lambda$ -, recA1, gyrA96, relA1,  $\Delta$ [argF-lacZYA]<sub>U196</sub>, [ $\phi$ 80dlacZM15]

### 2.3 Vektoren

pBluescript II KS (+): Stratagene, La Jolla, CA  
pUC18: Pharmacia; Länge 2,69kb

### 2.4 Oligonukleotide

Für die Race-Experimente:

5'-RT-GSP: 5'-TAAGGCCATAGGGCTG-3'  
5'-GSP: 5'-AACCAAGCTTTCCCAGGTACC-3'  
5'-GSPnes: 5'-AGCGCTGGATGTGGTACTTGG-3'  
3'-GSP: 5'-AAGCTTCAGCGTGAACAGCAG-3'  
3'-GSPnes: 5'-ATACAGGAGTTGGAGATGCAGG-3'  
J 3'for: 5'-ATCACATCCTCAGCACTCTGCTC-3'  
J 3'rev: 5'-ATCCATGCTGACGCTGCTCTTG-3'  
J 3'for2: 5'-GTCAGCATGGATGAGAATGAAG-3'  
J 3'PCR for: 5'-TCAATGACATCCTCATGGAAGAC-3'  
J 3'PCR rev: 5'-CTGCAACTGTGTTAGCCTCTTG-3'

Für die Klonierung der CBA-TATA Plasmide und zur Anwendung in EMSA-Studien:

A wt: 5'-AGCTTATTATCCTGAGCATGTGATGCTCATATTAT-3'  
A mut:5'-AGCTTATTATCCTGAGGAATTCATGCTCATATTAT-3'  
B wt: 5'-AGCTTGGCAACAGCAGCATGTGACTAGCCTGTGAT-3'  
B mut:5'-AGCTTGGCAACAGCAGGAATTCACTAGCCTGTGAT-3'  
C wt: 5'-ACAGGCTTGCGTCCATGTGACATTATGTAAAAGCT-3'  
C mut:5'-ACATTCTTGCGTGAATTGACATTATGTAAAAGCT-3'

Die E-Box Sequenz bzw. die mutierte E-Box Sequenz ist jeweils unterstrichen.

Für die Klonierung des Expressionsvektors Mitf-M und der Mutante:

myctag up:

5'- TCGAGCCACCATGGAGCAGAAGCTGATCTCCGAGGAGGACCTGAT- 3'

myctag down:

5'- ATCAGGTCCTCCTCGGAGATCAGCTTCTGCTCCATGGTGGC- 3'

MitfM for: 5'-GCAGCGCTGGAGATGCTGGAATA- 3'

MitfM rev: 5'-CTCTAGACTAACATCCATGGTCTTTC- 3'

## 2.5 Enzyme und Enzymkits

Die Enzyme wurden von GIBCO BRL Life Technologies, Neu Isenburg, von New England Biolabs GmbH, Schwalbach, der Deutschen Pharmacia LKB GmbH; Freiburg, sowie von Tecnomara, Fernwald, bezogen und bei -20°C gelagert.

Enzymkits: Sequenase™ DNA Sequencing, USB, Cleveland, Ohio

5' bzw. 3'RACE-Kit, GIBCO BRL Life Tech., Neu Isenburg

## 2.6 Antikörper

anti- HA: polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, das gegen eine Peptidsequenz einer inneren Region des Influenza Hämagglutinin (HA) Proteins gerichtet ist

(HA-probe Y-11, Santa Cruz Biotechnology, sc-805, lot#I2002)

anti- myc: monoklonaler Antikörper aus der Maus (aus Milzzellen von BALB/c Mäusen), gegen ein Fusionspeptid (aus Sp2 Maus-Myelomzellen) gerichtet

(c-Myc 9E10, Santa Cruz Biotechnology; sc-40, lot#D242)

anti- mitf: polyklonaler, affinitätsgereinigter Antikörper aus der Ziege, der gegen eine Peptidsequenz nahe des Aminoterminus des menschlichen MITF Proteins gerichtet ist

(MITF N-19, Santa Cruz Biotechnology; sc-10999, lot#A031)

Zur Detektion in der Western Blot Analyse wurden Peroxidase (HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper von Santa Cruz Biotechnology verwendet:

anti- Kaninchen: polyklonales Ziegen Serum, gegen die schwere und leichte Kette von Kaninchen IgGs gerichtet

anti- Maus: polyklonales Ziegen Serum, gegen die schwere und leichte Kette von Maus IgGs gerichtet

anti- Ziege: polyklonales Esel Serum, gegen die schwere und leichte Kette von Ziegen IgGs gerichtet

## 2.7 Chemikalien und Radiochemikalien

Alle hier nicht im einzelnen aufgeführten Chemikalien waren von höchster Reinheit (p.A.) und wurden bezogen von:

Deutsche Pharmacia LKB GmbH, Freiburg

Difco Lab., Detroit, MI

E.Merck, Darmstadt

Fluka AG, Buchs, Schweiz

GIBCO BRL Life Technologies, Neu Isenburg

Riedel-de Haen AG, Seelze

Roth GmbH, Karlsruhe

SERVA Feinbiochemica GmbH, Heidelberg

SIGMA Chemie GmbH, Taufkirchen

Folgende Isotopen-markierte Nukleosidtriphosphate der Firma Amersham Buchler, Braunschweig wurden verwendet:

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP      3000 Ci/mmol

$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dATP      3000 Ci/mmol

$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  dATP      3000 Ci/mmol

$[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]$  dATP      600 Ci/mmol

## 2.8 Medien und Pufferlösungen

Alle nicht gesondert erwähnten Puffer und Lösungen wurden nach Maniatis et al., 1982 hergestellt. Sämtliche Medien und Puffer wurden in Millipore Wasser angesetzt und, sofern nicht anders angegeben, durch Autoklavieren sterilisiert.

Für die Zellkulturmedien F12 und DMEM wurden Trockenmedien der Firma GIBCO (Neu Isenburg) verwendet, die nach Vorschrift des Herstellers angesetzt und mittels eines 0,2 µm Filteraufsatzes sterilfiltriert wurden. Die Zellkulturmedienzusätze L-Glutamin (200 mM) und Penicillin/Streptomycin ( $10^4$  U/ml) wurden ebenfalls von GIBCO bezogen.

## 2.9 Geräte

Zentrifugen:	Eppendorf-Centrifuge 5415 C Sorvall <sup>®</sup> RC-5B (Rotoren: GSA, SS34) Heraeus Biofuge pico Heraeus Biofuge 15R
Zellkulturinkubatoren:	Heraeus
Sequenziergerät:	CEQ 2000XL DNA Sequenzer (Beckman-Coulter)
PCR-Thermocycler:	Biometra T3 Thermocycler
Luminometer:	Berthold Lumat LB 9501
UV-Spektralphotometer:	Pharmacia LKB Ultrospec II
UV-Transilluminatoren:	HerolabUVT 2020
Szintillationszähler:	Beckmann LS 1801; Kontron MR300
Röntgenfilmentwickler:	Gevamatic 110, Agfa-Gevaert, Konica QX70
UV-Fixierung:	Biorad
Gel-Scanner:	Pharmacia LKB ULTROSCAN XL Software: GelScan XL
Mini Gel Kammer:	Biometra Minigel G42 / Minigel-Twin G42

Mini Blot Kammer: BIORAD MINI TRANS BLOT®

Text- und Grafikverarbeitung:

Hardware ASUS Notebook PC

Macintosh Performa 5500/250

Software Microsoft Word 97

Microsoft Exel 97

Microsoft PowerPoint 97

GraphPad Software InStat 2.01

## 3 Methoden

### 3.1 DNA-Klonierungstechniken

#### 3.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

##### Plasmid-DNA-Minipräparation mit alkalischer Lyse

Geringe Mengen reiner Plasmid-DNA wurden nach folgender Schnellmethode präpariert und für Restriktionsanalysen verwendet. 1 ml Bakterien-Suspension einer 3 ml LB-Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation (Eppendorf-Tischzentrifuge, RT, 5 min, 5000 UpM) pelletiert und in 100 µl TE resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl SDS/NaOH und kurzem Invertieren des Eppendorf-Reaktionsgefäßes wurde bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Es wurden zur Neutralisation 150 µl kaltes 3 M KOAc zugegeben, der Ansatz für 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend die Zelltrümmer durch 10-minütige Zentrifugation bei 14 000 UpM (Eppendorf-Tischzentrifuge) abgetrennt. Zum Überstand wurden 400 µl Phenol/Chloroform (1:1) gegeben und gevortext, um die Proteine zu denaturieren. Der Ansatz wurde erneut 10 min bei 14 000 UpM zentrifugiert. Nach Überführen von 350 µl der Wasserphase in ein neues Reaktionsgefäß wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 1 ml 100% Ethanol gefällt. Nach Waschen mit 70% Ethanol, Zentrifugation und Trocknung wurde das Pellet in 30 µl TE-Puffer resuspendiert. Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden 6 µl eingesetzt.

SDS/NaOH	0,2M	NaOH
	1%(w/v)	SDS
TE	TRIS-EDTA Puffer, siehe Maniatis, 1982	

##### Plasmid-DNA-Midipräparation

Die Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA erfolgte mittels des Plasmid Midi bzw. Plasmid Maxi Kits der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben.

### 3.1.2 PCR (polymerase chain reaction)

Mittels „polymerase chain reaction“, PCR, wurden spezifische DNA-Fragmente, gegebenenfalls unter Einführung neuer Restriktionsschnittstellen, amplifiziert. Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden dann, nach Restriktionsspaltung und Aufreinigung durch Agarose-Gelelektrophorese, zur weiteren Klonierung eingesetzt.

Ein Standard-Reaktionsansatz zur DNA-Amplifikation von Plasmid-Matrizen ist unten angegeben. Die zuletzt zugegebene Taq-Polymerase wurde vorsichtig mit dem gesamten Ansatz vermischt. Die jeweils verwendeten Reaktionszeiten und -temperaturen sind an entsprechender Stelle im Ergebnisteil angegeben und richteten sich nach den eingesetzten Primern und der Länge des zu amplifizierenden Fragments.

Reaktionsansatz einer PCR:

8 µl Nukleotidmix	alle vier dNTPs, jew. 1,25 mM
5 µl Polymerasepuffer	10x, GIBCO
1 µl Primer 1	50 pmol/µl
1 µl Primer 2	50 pmol/µl
2-4 µl Plasmid DNA	1-5 ng
ad 49 µl H <sub>2</sub> O	
1 µl Taq-Polymerase	5 U/µl, GIBCO

### 3.1.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur analytischen sowie präparativen Spaltung von Plasmid-DNA wurde jeweils 1 U/µg DNA des gewünschten Restriktionsenzym eingesetzt. Puffer und Reaktionsbedingungen wurden den Herstellerangaben entsprechend gewählt.

### 3.1.4 Auffüllen überhängender 5'-Enden mit Klenow-Polymerase

Nach dem Abstoppen des Restriktionsansatzes durch Inkubation bei 68°C für 10 min wurden direkt 5 U Klenow-Polymerase zugegeben und der Ansatz für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl dNTP-Mix (je 1,25 mM der vier dNTPs) zugesetzt und für weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 68°C für 10 min gestoppt. Die modifizierte DNA wurde anschließend entweder direkt mittels Gelelektrophorese aufgetrennt oder alternativ zur weiteren Behandlung mit Phosphatase mit 0,5 Volumen Amoniumacetat oder 2,5 Volumen Ethanol gefällt.

### 3.1.5 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Zur Vermeidung der Selbstligierung isolierter DNA-Fragmente mit identischen Enden wurden die 5'-terminalen Phosphatgruppen durch Behandlung mit hitzeinaktivierter, alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm („calf intestine phosphatase“, CIP) abgespalten. Die DNA wurde in 20 µl NEB Puffer 2 + H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 0,2 U CIP pro pmol 5'-Enden (1 µg 1 kb-DNA entspricht 3,08 pmol) 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Abtrennung des Enzyms wurde die DNA nach Extraktion mit Phenol/Choroform (1:1, v:v) mit EtOH gefällt.

Puffer: käuflicher 10 x „Buffer 2“ (NEB)

### 3.1.6 Phosphorylierung von DNA-Enden

Zur Phosphorylierung unphosphorylierter 5'-DNA-Enden wurde die Bakteriophagen T4-Polynukleotid-Kinase (T4-PNK, GIBCO) verwendet. Für die Phosphorylierungsreaktion wurde DNA (~ 5 µg) in 20 µl Puffer mit 10 mM ATP und 10 U T4-PNK 45 min bei 37°C inkubiert, und das Enzym anschließend mittels Phenolextraktion entfernt. Mononukleotide wurden auf einer Sephadex G25 Mikrospin-Säule abgetrennt.

Puffer: käuflicher 5 x „forward reaction buffer“ (GIBCO)

### 3.1.7 Ligation von DNA

Zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit kompatiblen, überhängenden oder glatten Enden wurde das Enzym T4-DNA-Ligase (GIBCO) verwendet. Die Konzentration der DNA-Fragmente im Ansatz wurde so gewählt, dass das molare Verhältnis der Enden von Vektor zu Insert 1:1 bis 1:3 betrug. Insgesamt wurden 100-200 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Ligation erfolgte mit 2 U T4-Ligase im vom Hersteller empfohlenen Puffer über Nacht bei 16°C im Wasserbad. Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde anschließend zur Transformation eingesetzt.

### 3.1.8 Transformation kompetenter Bakterien

Für Transformationen wurden frisch kultivierte, hochkompetente *E.coli* DH5α Zellen eingesetzt (Präparation nach Hanahan, 1985). 50 ml SOB-Medium in einem 250 ml -Erlenmeyerkolben, zu dem 1 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> frisch zugegeben worden war, wurde dazu mit 3 ml Übernachtskultur des Wirtstammes angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 0,4 und 0,7 bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 3500 UpM 5 min zentrifugiert, einmal in 5 ml kaltem TFB gewaschen und schließlich erneut in 2 ml TFB aufgenommen. Die Suspension wurde 30 min auf Eis inkubiert, nach Zugabe von 70 µl DnD und vorsichtiger Durchmischung waren die nun kompetenten Zellen bereit für die Transformation. 100 µl kompetenter Bakterienzellen wurden dafür mit der zu transformierenden DNA vermischt und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Nach 90-sekündigem Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C und Abkühlen auf Eis wurde der Ansatz in 3 ml LB-Medium gegeben und für 30-90 min bei 37°C vorsichtig geschüttelt. Nach Zentrifugation (3500 UpM, 5 min) wurde das Bakterienpellet in 70-100 µl Medium resuspendiert und vorsichtig auf Agar-Platten ausplattiert. Bei erfolgreicher Transformation konnten nach über-Nacht-Inkubation bei 37°C Einzelkolonien isoliert werden.

DnD:	1 M	DTT
	90%	DMSO
	10 mM	KOAc pH 7,5
TFB:	100 mM	KCl
	5 mM	MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O
	10 mM	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O
	3 mM	Hexamin Co(III)Chlorid
	10 mM	K-MES
		pH 6,2
SOB:	20 g/l	Bacto-Tryptone
	5 g/l	Hefeextrakt
	2,5 mM	KCl
	10 mM	NaCl
		pH 7,6 mit KOH; Zugabe von 1 ml/l 1 M MgSO <sub>4</sub> (steril)

### **3.1.9 Klonierungen**

#### **3.1.9.1 Klonierung verschiedener LUC+ Reporter-Gen-Konstrukte**

Die folgenden Konstrukte wurden von Frau Jutta Duschl kloniert; und später im Rahmen der Projektweiterführung in verschiedenen Experimenten eingesetzt.

Tyr -82, Länge: 4817 bp

Medaka Tyrosinase Minimal-Promotor vor LUC+

Tyr -852, Länge: 5557 bp

Medaka Tyrosinase Promotor (-852) mit Mitf-Bindungsstelle A vor LUC+

Tyr -3173, Länge: 7878 bp

Medaka Tyrosinase Promotor (-3173) vor LUC+

Tyr -284, Länge: 5001 bp

Medaka Tyrosinase Promotor (-284; schließt die Mitf-Bindungsstelle A mit ein) vor LUC+

Tyr I, Länge: 7878 bp

Tyr II, Länge: 6444 bp

Tyr III, Länge: 6444 bp

Tyr -284mut, Länge: 5001 bp

Medaka Tyrosinase Promotor (-284; mit der nicht-funktionstüchtigen Mitf-Bindungsstelle A, siehe Oligo Amut) vor LUC+

TATA, Länge: 4643 bp

publiziert als pTATALUC+ (Altschmied und Duschl, 1997)

Teilweise unter Verwendung obiger Konstrukte wurden die folgenden Plasmide kloniert:

Tyr-TATA, Länge: 6270 bp

Erhalten durch Ersatz eines 2,3 kb Bgl II/EcoRI Fragments (Ol tyr Promotor und LUC+) in Tyr II mit einem 2,1 kb BamHI/EcoRI Fragment aus TATA (tk-TATA Box und LUC+).

CBA-TATA

Sequentielle Insertion der Oligonukleotide C wt, B wt und A wt in die Hind III Schnittstelle 5´ zur tk-TATA-Box;

TATA wurde hierfür mit Hind III geschnitten, um ein lineares Plasmid zu bekommen; und dann dephosphoryliert. Das erste phosphorylierte Oligo (Oligo A) wurde mit dem Vektor ligiert, um so das Konstrukt A-TATA zu erhalten. Dieses wurde dann behandelt wie TATA zuvor, das nächste Oligo (Oligo B) in diesen Vektor ligiert, und man erhielt das Konstrukt BA-TATA. Dieses wurde wiederum geschnitten mit Hind III, das linearisierte Plasmid dann ligiert mit Oligo C und man erhielt das gewünschte Konstrukt CBA-TATA.

Die Größe der Konstrukte (abhängig von der Anzahl der eingebauten Oligos):

X-TATA: Länge: 4678 bp

XX-TATA: Länge: 4713 bp

XXX-TATA: Länge: 4748 bp

BTyr -284, Länge: 5036 bp

Mittels des Restriktionsenzym Hind III wurde das Plasmid Tyr -284 linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Das phosphorylierte Oligo B wurde in den geöffneten Vektor ligiert.

CBTyr -284, Länge: 5071 bp

Für dieses Konstrukt wurde BTyr -284 linearisiert, anschließend dephosphoryliert und dann das phosphorylierte Oligo C in den Vektor kloniert.

BTyr -284mut, Länge: 5036 bp

und

CBTyr -284mut, Länge: 5071 bp

Diese beiden Plasmide wurden entsprechend kloniert (s.o.).

### **3.1.9.2 Klonierung eines XMitf-M Expressionsplasmids**

Das die Mitf-Isoform M von *Xiphophorus* exprimierende Plasmid pCMVtkmyc Mitf-M (XMitf-M) wurde nach folgender Strategie kloniert: Austausch von LUC+ in pCMVtkLUC+ durch die kodierende Sequenz von Mitf-M mit einem 5' liegenden myc-tag.

Das Konstrukt wurde mittels folgender Klonierungsschritte erhalten: Klonierung des myc-tags als Oligonukleotid mit XhoI/EcoRV-Enden in den pBluescript II KS (+) Vektor (siehe unter 2.4, Sequenzen: myctag up und myctag down); parallel wurde eine Amplifikation der kodierenden Sequenz von Mitf-M mit Oligonukleotiden (siehe unter 2.4, Sequenzen: MitfM for und MitfM rev) durchgeführt, eine Eco47III Schnittstelle am Anfang und eine Xba I Schnittstelle am Ende einführend, und dann in einen pUC 18 (SureClone, Promega) Vektor kloniert. Dieses Eco47III/Xba I Fragment mit Mitf-M wurde in den Vektor mit dem myc-tag kloniert, das mittels EcoRV/Xba I geöffnet worden war; LUC+ in pCMVtkLUC+ wurde ersetzt durch das Xho I/Xba I Fragment.

Zu diesem Expressionsplasmid wurde eine Mutante kloniert, die in Experimenten als Kontrolle eingesetzt wurde. Dieses Konstrukt wird im folgenden mit pCMVtkmyc Mitf-Mmut (XMitf-Mmut) bezeichnet und besteht aus dem identischen Vektor (s.o.), der aber im myc-tag eine Punktmutation trägt, welche zu einem verschobenen Leseraster und somit zu einem

verfrühten Abbruch der Translation führt. Dieses Expressionsplasmid ergibt theoretisch ein Protein von unbekannter Sequenz mit 91 Aminosäuren.

### 3.2 DNA-Gelelektrophorese

#### 3.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde sowohl zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten als auch für analytische Zwecke verwendet.

Zur Elektrophorese wurden die DNA-Proben mit Ladepuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und bei 10 V/cm in 0,5 x TBE-Laufpuffer aufgetrennt. Die Konzentration der Agarose richtete sich nach der Größe der zu trennenden Fragmente. Zur Sichtbarmachung der DNA wurde das Gel nach dem Lauf mit Ethidiumbromid gefärbt und im Falle analytischer Gele im kurzwelligen UV-Licht (254 nm) analysiert. Für die Isolierung von DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden Banden im langwelligen UV-Licht (366 nm) detektiert und ausgeschnitten.

10 x Ladepuffer:	30% (w/v)	Ficoll 400
	0,05% (w/v)	Bromphenolblau
	0,05% (w/v)	Xylencyanol
	0,05% (w/v)	Orange G
10 x TBE-Puffer:	0,9 M	Tris-Base
	0,9 M	Borsäure
	20 mM	EDTA, pH 8,0-8,3

### 3.2.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Denaturierende Polyacrylamid-Gele wurden für die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Sequenzierungsreaktionen verwendet. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit Formamid-Puffer versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Nach einem Vorlauf bei 30 V/cm erfolgte die Elektrophorese für mehrere Stunden bei 50 V/cm bzw. 40-45 W. Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Gel getrocknet und autoradiographiert.

Formamid-Puffer:	50% (w/v)	Formamid
	0,05% (w/v)	Bromphenolblau
	0,05% (w/v)	Xylencyanol
Gellösung:	6-8% (w/v)	Acrylamidlösung
	50% (w/v)	Harnstoff
	1 x	TBE
	0,05% (w/v)	APS
	0,05% (w/v)	TEMED

### 3.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten

Extraktion aus Agarose-Gelen

Die Elution von DNA aus Agarose erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN) bzw. des CONCERT™ Rapid Gel Extraction System (GIBCO) nach Protokoll des Herstellers.

### **3.3 Radioaktive Markierung von DNA**

#### **3.3.1 3'-Endmarkierung**

(für Gelretardierungs-Experimente)

Überhängende 5'-Enden von DNA-Restriktionsfragmenten oder doppelsträngigen Oligonukleotiden können durch das Klenow-Fragment der *E.coli*-DNA-Polymerase in Anwesenheit von [ $\alpha$ - $^{32}$ P]- Nukleosidtriphosphaten aufgefüllt und so radioaktiv markiert werden. Für die Reaktion wurde DNA mit 3 pmol 5'-überhängenden Enden mit 30-50  $\mu$ Ci (3000 Ci/mmol) des einzubauenden [ $\alpha$ - $^{32}$ P]- Nukleotids (dATP bzw. dCTP), 5  $\mu$ l Nukleotid-Mix (je 1 mM der anderen dNTPs) und 5 U Klenow-Enzym in 25  $\mu$ l Klenow-Reaktionspuffer 30 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 5  $\mu$ l 1 mM dATP bzw. dCTP und weiteren 30 min Inkubation bei RT wurde die Reaktion mit TE auf 100  $\mu$ l aufgefüllt, und der Ansatz über eine Sephadex G25 Mikrospin-Säule gereinigt.

#### **3.3.2 Primer-Endlabelling**

(für Sequenzierungen)

Die radioaktive Markierung der Primer erfolgte nach dem Protokoll des für die Sequenzierung verwendeten Cycle Sequencing Kits der Firma Pharmacia unter Einsatz von [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP.

### **3.4 RACE-Experimente (Rapid amplification of cDNA ends)**

#### **3.4.1 3'RACE**

Mit dieser Methode lassen sich unbekannte Sequenzen einer mRNA zwischen einer definierten, bekannten Sequenz in der mRNA und dem 3' polyA-Ende amplifizieren. Zunächst wird dabei von der Reversen Transkriptase ein polyT geprimter cDNA-Erststrang synthetisiert. Dieser wird in eine PCR eingesetzt, bei der ein von der definierten, bekannten Sequenz der mRNA abgeleiteter Primer verwendet wird. Der spezifische Primer sollte mit dem Primer, der an das polyA-Ende hybridisiert, nur die spezifischen

Erststrang cDNA-Produkte amplifizieren. Es wurde für diese Experimente das 3'RACE-System von GIBCO BRL verwendet und nach dem beigefügten Protokoll vorgegangen. Die PCR-Reaktionen wurden mit Taq-Polymerasen ebenfalls der Firma GIBCO und den zugehörigen Puffern durchgeführt (Bedingungen siehe 3.1.2 und Ergebnisteil). Die PCR-Produkte wurden direkt mittels eines automatischen Sequenziergeräts sequenziert (siehe 3.5.1).

### **3.4.2 5'RACE**

Die 5'RACE ist ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuresequenzen einer messenger RNA Matrize zwischen einer bestimmten internen Sequenz und unbekannt Sequenzen am 5' Ende der mRNA. Es findet dabei mittels eines genspezifischen antisense Oligonukleotids (GSP1) eine "first strand" cDNA-Synthese statt. Nach der cDNA-Synthese werden aus dem "first strand" Produkt die nicht eingebauten dNTPs und GSP1 entfernt. TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) wird eingesetzt, um homopolymerische Enden an das 3' Ende der cDNA anzuhängen. Diese cDNA wird dann mittels PCR und unter Einsatz dreier Primer amplifiziert. Es wird ein "nested" genspezifischer Primer (GSP2) eingesetzt, der sich 3' an GSP1 hängt, sowie eine Kombination zweier bestimmter Primer (siehe Protokoll von GIBCO), die die Amplifikation des homopolymerischen Endes erlaubt. Dieses Verfahren ermöglicht eine Amplifikation unbekannter Sequenzen zwischen GSP2 und dem 5' Ende der mRNA.

Um eine Sequenz in 5' Richtung zu komplettieren, wurde das 5'RACE-System von GIBCO verwendet und dem Herstellerprotokoll entsprechend durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden direkt mittels eines automatischen Sequenziergeräts sequenziert (siehe 3.5.1).

### **3.5 Sequenzanalyse von DNA**

Die Sequenzanalyse doppelsträngiger Plasmid-DNA wurde nach dem enzymatischen Kettenabbruch-Verfahren (nach Sanger, 1977) durchgeführt. DNA wurde dafür zunächst in 0,2 M NaOH, 0,2 mM EDTA pH 8,3 denaturiert, mit EtOH präzipitiert und anschließend mit einer modifizierten T7-DNA-Polymerase (Sequenase<sup>TM</sup>) und [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] dATP unter Verwendung des Sequenase<sup>TM</sup>-Kits von USB nach dem Protokoll des Herstellers sequenziert. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Fragmente in denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt (s. 3.2.2).

PCR-Produkte wurden direkt und nicht-radioaktiv sequenziert. Hierfür wurde der CEQ<sup>TM</sup> DTCS Dye Terminator Cycle Sequencing Kit verwendet und mittels eines CEQ 2000XL DNA Sequenziergeräts von Beckman-Coulter sequenziert.

### **3.6 Zellkultur und Zellaufschlußverfahren**

#### **3.6.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen**

Die Fischzelllinien PSM und A2 wurden in F12 -Medium bei 28°C / 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Dem Medium wurde vor Gebrauch 10% FCS und 1% einer Penicillin/Streptomycin Stammlösung zugesetzt. Die adhärent wachsenden Zellen wurden vor Erreichen konfluenten Wachstums subkultiviert. Dazu wurden die Zellen durch Abspülen mit frischem Medium abgelöst und auf frische Zellkulturplatten umgesetzt.

Die Säugerzelllinien 293T, BHK Hm und NIH 3T3 Hm wurden bei 37°C / 5% CO<sub>2</sub> in DMEM Medium mit den oben aufgeführten Zusätzen kultiviert und vor Erreichen konfluenten Wachstums unter zu Hilfenahme von Trypsin-EDTA-Lösung subkultiviert.

Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase können in Gegenwart von 10% DMSO und 20% FCS durch langsames, kontinuierliches Abkühlen auf -80°C eingefroren und längerfristig in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Zur erneuten Kultur wurden die Zellen schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 5 ml Kulturmedium (F12) aufgenommen. Nach 5-minütiger

Zentrifugation (1100 UpM) wurden die Zellen in einem geeigneten Volumen Medium aufgenommen und auf Zellkulturschalen ausgesät.

Zusätze zu F12 bzw. DMEM Medium: 200 mM L-Glutamat  
Stammlsg.: 10000 U/ml Penicillin  
Stammlsg.: 10000 U/ml Streptomycin  
10% Fötale Kälberserum (FCS)

Einfriermedium: F12, 10% DMSO, 20% FCS

### **3.6.2 DNA-Transfer in eukaryontische Zellen mittels Kalzium-Phosphat-Methode**

Die Transfektion von Zellen basiert auf einer DNA/Kalziumphosphat-Cokristall-Bildung. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $1,2 \cdot 10^6$  Zellen pro 7 ml Medium in 10 cm Zellkulturplatten angesät. Nach ungefähr 24 Stunden wurde der Transfektionsmix aus 8 µg DNA und 50 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> (mit Aqua bidest aufgefüllt auf 500 µl), zugegebenen 500 µl 2x BBS und nach 45 min Inkubation bei RT direkt ins Medium pipettiert. Über Nacht inkubierten die Zellen entweder bei 28°C (Fischzelllinien) bzw. bei 37°C (Säugerzellen), dann wurde ihnen frisches Medium zugesetzt.

2x BBS:	50 mM	BES
	280 mM	NaCl
	1,5 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

### 3.6.3 Aufschluß eukaryontischer Zellen

#### Mikropräparation von Kernproteinextrakten

Zur schnellen Präparation von Kernproteinen ausgehend von kleinen Zellzahlen wurde das Protokoll von Andrews und Faller, 1991 mit geringen Modifikationen angewandt. Die Zellen ( $10^6$ - $10^7$  pro Ansatz) wurden auf der Kulturschale einmal mit PBS gewaschen, in 1 ml kaltem PBS mit Hilfe eines Gummischabers geerntet und in einem Reaktionsgefäß durch Zentrifugation (10 s, 14000 UpM, Eppendorf-Tischzentrifuge) pelletiert. Die Zellen wurden in 400 µl kaltem Puffer A vorsichtig resuspendiert und nach 10 min Inkubation auf Eis durch 10-maliges Passieren durch eine 0,45 mm Kanüle aufgeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation (10 s, 14000 UpM) wurden die sedimentierten Zellkerne der Pelletgröße entsprechend in 20-100 µl kaltem Puffer C aufgenommen und 20 min auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile wurde 2 min bei 4°C zentrifugiert (14000 UpM). Der Kernproteine enthaltende Überstand wurde 2 h gegen TM 100 dialysiert und anschließend nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

Puffer A:        10 mM    HEPES-KOH, pH 7,9  
                  1,5 mM    MgCl<sub>2</sub>  
                  10 mM    KCl

Puffer C:        20 mM    HEPES-KOH, pH 7,9  
                  25% (v/v) Glycerin  
                  420 mM    NaCl  
                  1,5 mM    MgCl<sub>2</sub>  
                  0,2 mM    EDTA, pH 8,0

TM 100:	20 mM	HEPES-KOH, pH 7,9
	1 mM	EDTA, pH 8,0
	100 mM	KCl
	20% (v/v)	Glycerin
	0,1% (v/v)	NP-40

Vor der Verwendung dieser Puffer wird jedem 1 mM DTT, 1 mM Benzamidin, sowie 0,5 mM PMSF frisch zugesetzt.

#### Proteinextraktion zur Messung von Reporter-genaktivitäten nach transienter Transfektion

Die Zellen ( $10^6$ - $10^7$  pro Ansatz) wurden auf der Kulturschale einmal mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS mit Hilfe eines Gummischabers geerntet und in einem Reaktionsgefäß durch Zentrifugation (5 min, 5000 UpM, Eppendorf-Tischzentrifuge) pelletiert. Die Zellen wurden, je nach Größe des Pellets, in 60-100 µl 1xRLB-Puffer (reporter lysis buffer von Promega) resuspendiert und nach 15-30 min Inkubation bei RT auf dem Schüttler erneut zentrifugiert (15 min, 14000 UpM). Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

#### **3.6.4 Luciferase-Aktivitätsbestimmung nach DNA-Transfer**

Die Luciferase-Aktivität wurde mittels eines Luminometers (Lumat, Berthold) festgestellt. Hierfür wurden 5 µg Protein vermessen. Einer Gesamtmenge von 15 µl Zellextrakt und Lysispuffer wurde 100 µl Luciferase Assay Mix (Promega) zugesetzt und anschließend im Luminometer vermessen.

### 3.7 Analyse von Proteinen

#### 3.7.1 Proteinbestimmung

(nach Bradford, 1976)

Diese Methode basiert auf der Bindung von Proteinen an Coomassie Brilliant Blue G-250. Die Bindung verursacht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nach 595 nm, welche photometrisch detektiert werden kann. 1 ml einer 1:5 verdünnten und durch einen Papierfilter filtrierten Proteinbestimmungs-Lösung (BIORAD) wurde mit einem entsprechenden Aliquot (5-10 µl) der zu vermessenden Proteinlösung vermischt, 5 min bei RT inkubiert, und anschließend die Absorption bei 595 nm im Spektralphotometer ermittelt. Als Referenz diente eine mit BSA erstellte Eichgerade.

#### 3.7.2 Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Auftrennung von Proteingemischen nach dem Molekulargewicht. Bei der SDS-PAGE nach Laemmli (1970) handelt es sich um eine diskontinuierliche Elektrophorese, bei der die Proteine zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel (4%) fokussiert und dann in einem höherprozentigen Trenngel separiert werden. Die Acrylamidkonzentration richtet sich dabei nach der Größe der aufzutrennenden Proteine und lag bei 7,5 oder 8%. Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Gellauf mit Laemmli-Puffer versetzt, 10 min bei 95°C denaturiert und bei 25-50 mA und maximal 200 V in SDS-Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt.

Trenngel:	375 mM	Tris, pH 8,8
	7,5-10% (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)
	0,1% (w/v)	SDS
	0,1% (w/v)	APS
	0,05% (w/v)	TEMED

---

Sammelgel:	250 mM	Tris, pH 6,8
	5% (w/v)	Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)
	0,1% (w/v)	SDS
	0,1% (w/v)	APS
	0,1% (w/v)	TEMED
3 x Laemmli-Puffer:	185 mM	TrisCl, pH 6,8
	6% (w/v)	SDS
	15% (v/v)	$\beta$ -Mercaptoethanol
	30% (v/v)	Glycerin
	0,03% (w/v)	Bromphenolblau
5 x SDS-Laufpuffer:	0,5% (v/v)	SDS
	7,2% (v/v)	Glyzin
	1,51% (v/v)	Tris-Base

### 3.7.3 Western-Blot-Analyse

Zur Detektion von Proteinen mit spezifischen Antikörpern müssen diese zunächst auf geeignete Membranen (z.B. Nitrozellulose) transferiert werden. Nach Äquilibrieren des Gels und der Membran in Transfer-Puffer (20 min, RT) werden die Proteine dafür im elektrischen Feld aus dem Gel auf die Membran geblottet. Ein quantitativer Transfer erfolgt in einer MINI-Blot-Kammer in Transfer-Puffer bei 250 mA und 4°C innerhalb von 90 min.

Nach dem Blotten wurden zunächst unspezifische Valenzen der Membran durch 10 min Inkubation in Block-Puffer abgesättigt. Der Filter wurde anschließend für 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper in Block-Puffer inkubiert und nachfolgend dreimal für jeweils 5 min in Wasch-

Puffer geschwenkt. Nach Bindung des Zweitantikörpers in Block-Puffer (1 h, RT) und drei jeweils 5-minütigen Waschschritten in Wasch-Puffer konnten Protein-Antikörper-Komplexe mit dem ECL-Detektionssystem (AMERSHAM) entsprechend dem Protokoll des Herstellers identifiziert werden.

Zur wiederholten Detektion mit anderen Antikörpern inkubiert man die Membran 30 min bei 50°C in Strip-Puffer. Nach intensivem Waschen in PBS (3 x 20 min) und Blocken in Block-Puffer kann der Filter erneut mit Antikörper inkubiert werden.

Transfer-Puffer:        25 mM    Tris-Base  
                              192 mM    Glyzin  
                              20% (v/v)    Methanol

Block-Puffer:         10 mM    Tris-Cl, pH 7,0  
                              150 mM    NaCl  
                              0,5% (w/v)    Tween 20  
                              3% (w/v)    BSA

Wasch-Puffer:        Block-Puffer ohne BSA

Strip-Puffer:         62,5 mM    Tris-Cl, pH 7,4  
                              100 mM     $\beta$ -Mercaptoethanol  
                              2% (w/v)    SDS

### 3.8 DNA-Protein-Bindungsstudien

Gelretardierungs-Experimente oder „Electrophoretic Mobility Shift Assays“ (EMSA) (Fried und Crothers, 1981; Lane et al., 1992) ermöglichen den Nachweis spezifischer Wechselwirkungen zwischen einem DNA-Fragment definierter Sequenz und spezifisch daran bindender Proteine. Die Detektion beruht auf der elektrophoretischen Mobilitätsänderung eines DNA-Fragments nach Bindung eines oder mehrerer Proteine in der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese, welche in einer herabgesetzten Wanderungsgeschwindigkeit des DNA-Protein-Komplexes gegenüber dem freien DNA-Fragment resultiert.

Die EMSA-Bindereaktion erfolgte in 20 µl Bindepuffer mit 5-20 µg Kernextrakt, 2 µg poly(dIdC)\*poly(dIdC), 2 µg/µl BSA, gegebenenfalls spezifischer Kompetitor-DNA und 90 mM KCl Endkonzentration, welche unter Berücksichtigung des Salzgehalts des Proteinextraktes eingestellt wurde. Nach 15 min Vorinkubation bei 4°C wurde dem Ansatz ca. 1-2 fmol (20000 cpm) eines radioaktiv markierten DNA-Fragments (s.3.3.2) zugesetzt und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Die Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe erfolgte in nativen 4-6%igen Polyacrylamid-Gelen mit 5% Glycerin in 0,25 xTBE, wobei ein konstanter Strom von 12 mA angelegt wurde. Nach dem Lauf wurde das Gel getrocknet und autoradiographiert.

EMSA-Bindepuffer:	10 mM	HEPES-KOH, pH 7,8
	2,5 mM	EDTA, pH 8,0
	5 mM	Spermidin
	2%(w/v)	Ficoll 400

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung des Transkriptionsfaktors Mitf

#### 4.1.1 Sequenzanalysen

Aus Säugetieren war bekannt dass der Transkriptionsfaktor Mitf in mindestens sieben Isoformen vorliegt (Saito et al., 2002), die sich in ihren Expressionsmustern voneinander unterscheiden. Diese Isoformen werden durch die Benutzung verschiedener Promotoren und durch alternatives Splicing von einem singulären *mitf* Gen generiert (Yasumoto et al., 1998; Uono et al., 2000b). Im Säugetier wird das Transkript der Isoform Mitf-M ausschließlich in Melanocyten und Melanomen exprimiert, während die anderen Isoformen in einem größeren Spektrum an Zellen und Geweben exprimiert sind (Amae et al., 1998b).

Neuere Analysen in niederen Vertebraten hatten auch hier auf das Vorhandensein verschiedener Proteinvarianten hingedeutet. Eigene Untersuchungen im Labor und die Isolierung zweier cDNAs wiesen ebenfalls auf verschiedene Proteinvarianten hin. Es lagen von *Xiphophorus* die komplette cDNA der Isoform Mitf-M, wie auch eine partielle cDNA für die Isoform B vor.

Es sollte versucht werden einen genaueren evolutionsbiologischen wie funktionalen Überblick der duplizierten Gene im Stammbaum der Teleostieren zu geben. Deshalb wurden *mitf* Gene einerseits in einem anderen Teleostier, dem Zahnkarpfen *Xiphophorus* analysiert, sowie die genomische Struktur der *mitf* Gene des fast vollständig sequenzierten Genoms von *Fugu (Takifugu) rubripes* und des verwandten Süßwasser-Kugelfisches *Tetraodon nigroviridis* betrachtet.

#### 4.1.1.1 Vergleichende Charakterisierung von XMitf-B und XMitf-M

Die cDNA der M-Isoform, im folgenden mit *Xmitf-m* bezeichnet, lag komplett vor, die cDNA für *Xmitf-b* nur teilweise. Damit vergleichende Analysen durchgeführt werden konnten, war eine vollständige cDNA auch der B-Isoform notwendig. Um die Sequenz zu komplettieren wurden 5'RACE- und 3'RACE- Experimente ausgeführt. Diese Prozedere amplifizieren Nukleinsäuresequenzen eines Messenger RNA Templates zwischen einer definierten internen Stelle und unbekanntem Sequenzen am 3' bzw. 5' Ende der mRNA.

Abbildung 4.1.1 zeigt das erhaltene PCR-Produkt einer 5'RACE-Amplifikation. Ein ungefähr 550 bp langes Sequenzstück war amplifiziert worden. Dieses PCR-Produkt wurde direkt zur Sequenzierung herangezogen. Die bereits bekannte Sequenz konnte in Richtung des 5' Endes weitergeführt werden und dadurch die cDNA in 5' Richtung verlängert werden.

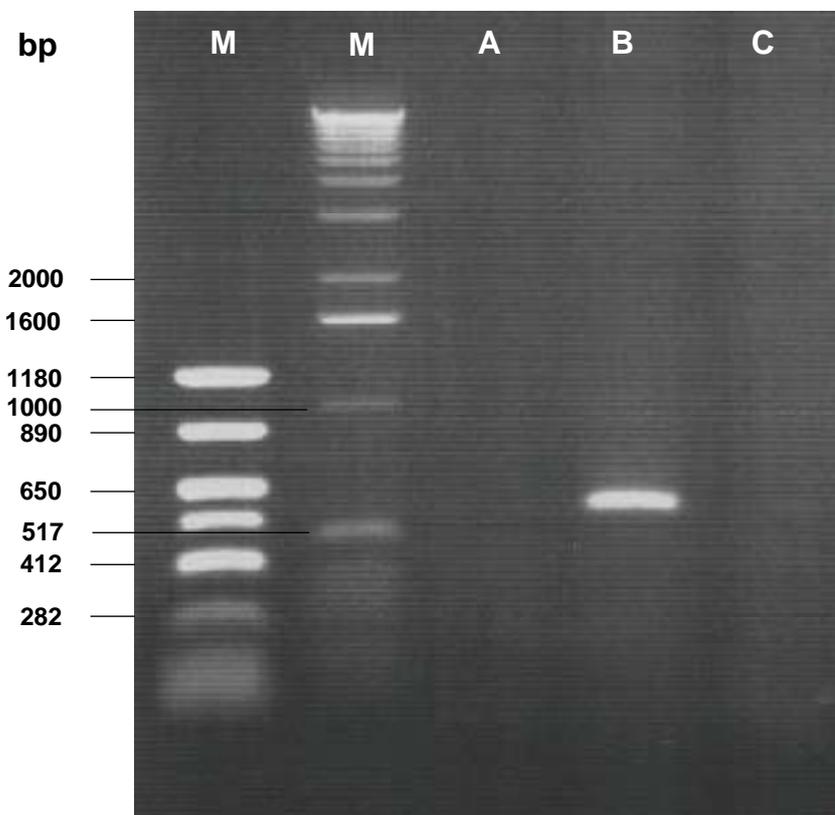


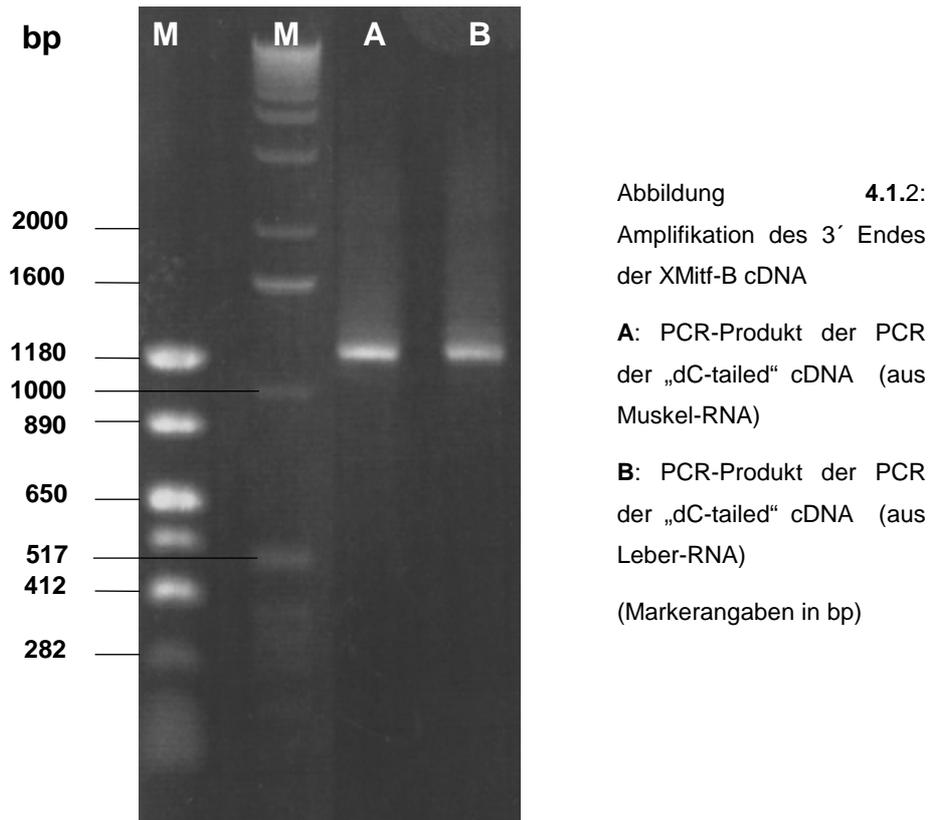
Abbildung 4.1.1:  
Amplifikation des 5'  
Endes der XMitf-B  
cDNA

**A:** PCR-Produkt  
der PCR der „dC-  
tailed“ cDNA

**B:** PCR-Produkt  
der „nested“  
Amplifikation des  
PCR-Produkts aus  
Probe A

**C:** Wasserkontrolle  
(Markerangaben in  
bp)

Um die cDNA für *Xmitf-b* auch in 3' Richtung zu vervollständigen, wurden 3'RACE-Experimente durchgeführt. Diese ergaben ein Fragment von ungefähr 1200 bp Länge, das ebenfalls sequenziert wurde (Abbildung 4.1.2).



Aus der vorhandenen partiellen cDNA und den 5' und 3'RACE Produkten konnte eine komplette cDNA für XMitf-B zusammengestellt werden. Diese besitzt einen offenen Leserahmen, der für 453 Aminosäuren kodiert (Abbildung 4.1.3).

Mit Hilfe des Sequenzvergleichsprogramms ClustalW wurden Vergleiche zwischen den beiden *Xiphophorus* Isoformen durchgeführt.



Die cDNA kennzeichnet sich durch das Vorhandensein von Exon 1a und 1b aus, deren Sequenzen fast identisch sind mit denen des Zebrafischs. Sie wurde daher als B-Form von *Xiphophorus* identifiziert und in Anlehnung an das entsprechende Gen im Zebrafisch mit *Xmitf-b* bezeichnet. Die Unterschiede zwischen den cDNAs für *Xmitf-m* und *Xmitf-b* sind nicht nur auf die 5´ Exons beschränkt, sondern treten über die gesamte Sequenz auf. Die beiden *Xiphophorus* Mitf Isoformen weisen nur eine Übereinstimmung von ungefähr 72% auf. Diese Daten lassen sich nur erklären mit dem Vorhandensein zweier Gene und weisen somit auf eine Herkunft aus zwei verschiedenen Genen hin.

Unter den Zugangsnummern (accession numbers) AF475090 für Mitf-M und AF475091 für Mitf-B wurden beide cDNA Sequenzen von *Xiphophorus* in der „EMBL/GenBank Data Libraries“ veröffentlicht.

#### 4.1.1.2 Sequenzanalysen im Vergleich mit anderen Spezies und Charakterisierung des evolutionären Ursprungs der Gene

Zur phylogenetischen Analyse wurden Sequenzvergleiche der Mitf Proteine aus verschiedenen Spezies durchgeführt (Altschmied et al., 2002). Diese sogenannten „Multiple sequence alignments“ wurden mit Hilfe des "PileUp" von GCG Wisconsin package (Version 10.0, Genetics Computer Group, Madison) erstellt. Für die Vergleichsstudien wurden die Proteinsequenzen folgender Spezies herangezogen (siehe Tabelle).

<b>Spezies</b>	<b>Isoform</b>	<b>Gen Bank Zugangsnummer</b>
<i>Homo sapiens</i>	hMITF	I38024
<i>Mus musculus</i>	Mitf	AAF81266
<i>Gallus gallus</i>	Mitf	AAF67467
<i>Danio rerio</i>	Mitf-M	AAD48371
<i>Danio rerio</i>	Mitf-B	AAK95588
<i>Xiphophorus</i>	Mitf-M	AF475090
<i>Xiphophorus</i>	Mitf-B	AF475091
<i>Fugu rubripes</i>	Mitf-M und -B	zur Verfügung gestellt: „Fugu Genome Consortium“
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Mitf-M und -B	zur Verfügung gestellt: Tetraodon Genom Projekt (Genoscope, Evry, Frankreich)

exon 1m

```
Xiphophorus-m MLEMLEYSHYO
F.rubripes-m MLEMLEYSHYO
T.nigroviridis-m MLEMLEYSHYO
D.erio-m MLEMLEYSHYO
H.sapiens MLEMLEYSHYO
M.musculus MLEMLEYSHYO
G.gallus MLEMLEYSHYO
```

exons 1a-b

```
Xiphophorus-b MQSESGIVDPDFEAGEPLQDEFKTYIELKSGPLKNSP+SPGR+GASKPPLGSSA+MTRILLRQOLMRRC+QGERRE+QGRQSSHYPP+...
F.rubripes-b MQSESGIVDPDFEAGEPLQDEFKTYIELKSGPLKNSP+SPGR+GASKPPLGSSA+MTRILLRQOLMRRC+QGERRE+QGRQSSHYPP+...
D.erio-b MQSESGIVDPDFEAGEPLQDEFKTYIELKSGPLKNSP+SPGR+GASKPPLGSSA+MTRILLRQOLMRRC+QGERRE+QGRQSSHYPP+...
H.sapiens MQSESGIVDPDFEAGEPLQDEFKTYIELKSGPLKNSP+SPGR+GASKPPLGSSA+MTRILLRQOLMRRC+QGERRE+QGRQSSHYPP+...
M.musculus MQSESGIVDPDFEAGEPLQDEFKTYIELKSGPLKNSP+SPGR+GASKPPLGSSA+MTRILLRQOLMRRC+QGERRE+QGRQSSHYPP+...
G.gallus MQSESGIVDPDFEAGEPLQDEFKTYIELKSGPLKNSP+SPGR+GASKPPLGSSA+MTRILLRQOLMRRC+QGERRE+QGRQSSHYPP+...
T.nigroviridis-m MQSESGIVDPDFEAGEPLQDEFKTYIELKSGPLKNSP+SPGR+GASKPPLGSSA+MTRILLRQOLMRRC+QGERRE+QGRQSSHYPP+...
Xiphophorus-b KTAW+PTPAINVSVV+VAGAG+QVPMEVLR
F.rubripes-b KTAW+PTPAINVSVV+VAGAG+QVPMEVLR
D.erio-b KTAW+PTPAINVSVV+VAGAG+QVPMEVLR
H.sapiens VFWV+PTPAINVSVV+VAGAG+QVPMEVLR
M.musculus VFWV+PTPAINVSVV+VAGAG+QVPMEVLR
G.gallus VFWV+PTPAINVSVV+VAGAG+QVPMEVLR
T.nigroviridis-m VFWV+PTPAINVSVV+VAGAG+QVPMEVLR
```

exons 2-9

```
Xiphophorus-b VQTHLENPTKYHIQRSQ+QOVKR+LGLK+L+GS+...+DALSH+PCPNOSDHH+GMPPFG+NSAFNSPMALLTLNSNCEKE+...
F.rubripes-b VQTHLENPTKYHIQRSQ+QOVKR+LGLK+L+GS+...+DALSH+PCPNOSDHH+GMPPFG+NSAFNSPMALLTLNSNCEKE+...
T.nigroviridis-b VQTHLENPTKYHIQRSQ+QOVKR+LGLK+L+GS+...+DALSH+PCPNOSDHH+GMPPFG+NSAFNSPMALLTLNSNCEKE+...
D.erio-b VQTHLENPTKYHIQRSQ+QOVKR+LGLK+L+GS+...+DALSH+PCPNOSDHH+GMPPFG+NSAFNSPMALLTLNSNCEKE+...
Xiphophorus-m VQTHLENPTKYHIQRSQ+QOVKR+LGLK+L+GS+...+DALSH+PCPNOSDHH+GMPPFG+NSAFNSPMALLTLNSNCEKE+...
F.rubripes-m VQTHLENPTKYHIQRSQ+QOVKR+LGLK+L+GS+...+DALSH+PCPNOSDHH+GMPPFG+NSAFNSPMALLTLNSNCEKE+...
T.nigroviridis-m VQTHLENPTKYHIQRSQ+QOVKR+LGLK+L+GS+...+DALSH+PCPNOSDHH+GMPPFG+NSAFNSPMALLTLNSNCEKE+...
D.erio-m VQTHLENPTKYHIQRSQ+QOVKR+LGLK+L+GS+...+DALSH+PCPNOSDHH+GMPPFG+NSAFNSPMALLTLNSNCEKE+...
H.sapiens VQTHLENPTKYHIQRSQ+QOVKR+LGLK+L+GS+...+DALSH+PCPNOSDHH+GMPPFG+NSAFNSPMALLTLNSNCEKE+...
M.musculus VQTHLENPTKYHIQRSQ+QOVKR+LGLK+L+GS+...+DALSH+PCPNOSDHH+GMPPFG+NSAFNSPMALLTLNSNCEKE+...
G.gallus VQTHLENPTKYHIQRSQ+QOVKR+LGLK+L+GS+...+DALSH+PCPNOSDHH+GMPPFG+NSAFNSPMALLTLNSNCEKE+...
```

```
exon 3 aad
Xiphophorus-b ...MDDVIDDII+SLSSSYD+DEI+LGL+MDPGLQMAN+L+PVSAN+L+DMYGNQG+M+PQO+SLP+ISNSCPAN+LSNIKRE+YSV+SQ
F.rubripes-b ...MDDVIDDII+SLSSSYD+DEI+LGL+MDPGLQMAN+L+PVSAN+L+DMYGNQG+M+PQO+SLP+ISNSCPAN+LSNIKRE+YSV+SQ
T.nigroviridis-b ...MDDVIDDII+SLSSSYD+DEI+LGL+MDPGLQMAN+L+PVSAN+L+DMYGNQG+M+PQO+SLP+ISNSCPAN+LSNIKRE+YSV+SQ
D.erio-b ...MDDVIDDII+SLSSSYD+DEI+LGL+MDPGLQMAN+L+PVSAN+L+DMYGNQG+M+PQO+SLP+ISNSCPAN+LSNIKRE+YSV+SQ
Xiphophorus-m ...MDDVIDDII+SLSSSYD+DEI+LGL+MDPGLQMAN+L+PVSAN+L+DMYGNQG+M+PQO+SLP+ISNSCPAN+LSNIKRE+YSV+SQ
F.rubripes-m ...MDDVIDDII+SLSSSYD+DEI+LGL+MDPGLQMAN+L+PVSAN+L+DMYGNQG+M+PQO+SLP+ISNSCPAN+LSNIKRE+YSV+SQ
T.nigroviridis-m ...MDDVIDDII+SLSSSYD+DEI+LGL+MDPGLQMAN+L+PVSAN+L+DMYGNQG+M+PQO+SLP+ISNSCPAN+LSNIKRE+YSV+SQ
D.erio-m ...MDDVIDDII+SLSSSYD+DEI+LGL+MDPGLQMAN+L+PVSAN+L+DMYGNQG+M+PQO+SLP+ISNSCPAN+LSNIKRE+YSV+SQ
H.sapiens ...MDDVIDDII+SLSSSYD+DEI+LGL+MDPGLQMAN+L+PVSAN+L+DMYGNQG+M+PQO+SLP+ISNSCPAN+LSNIKRE+YSV+SQ
M.musculus ...MDDVIDDII+SLSSSYD+DEI+LGL+MDPGLQMAN+L+PVSAN+L+DMYGNQG+M+PQO+SLP+ISNSCPAN+LSNIKRE+YSV+SQ
G.gallus ...MDDVIDDII+SLSSSYD+DEI+LGL+MDPGLQMAN+L+PVSAN+L+DMYGNQG+M+PQO+SLP+ISNSCPAN+LSNIKRE+YSV+SQ
```

```
exon 5b basic helix loop helix
Xiphophorus-b ...S+I+M+H+M+L+D+K+S+G+K+K+F+D+T+V+Q+R+P+G+P+V+E+V+R+A+L+A+K+E+R+Q+K+K+D+N+H+L+I+E+R+R+R+F+N+I+N+D+R+I+K+E+L+G+T+L+I+P+K+S+N+D+P+M+R+W+N+K+G+T+I+L+K+S+V+D+Y+I
F.rubripes-b ...S+I+M+H+M+L+D+K+S+G+K+K+F+D+T+V+Q+R+P+G+P+V+E+V+R+A+L+A+K+E+R+Q+K+K+D+N+H+L+I+E+R+R+R+F+N+I+N+D+R+I+K+E+L+G+T+L+I+P+K+S+N+D+P+M+R+W+N+K+G+T+I+L+K+S+V+D+Y+I
T.nigroviridis-b ...S+I+M+H+M+L+D+K+S+G+K+K+F+D+T+V+Q+R+P+G+P+V+E+V+R+A+L+A+K+E+R+Q+K+K+D+N+H+L+I+E+R+R+R+F+N+I+N+D+R+I+K+E+L+G+T+L+I+P+K+S+N+D+P+M+R+W+N+K+G+T+I+L+K+S+V+D+Y+I
D.erio-b ...S+I+M+H+M+L+D+K+S+G+K+K+F+D+T+V+Q+R+P+G+P+V+E+V+R+A+L+A+K+E+R+Q+K+K+D+N+H+L+I+E+R+R+R+F+N+I+N+D+R+I+K+E+L+G+T+L+I+P+K+S+N+D+P+M+R+W+N+K+G+T+I+L+K+S+V+D+Y+I
Xiphophorus-m ...S+I+M+H+M+L+D+K+S+G+K+K+F+D+T+V+Q+R+P+G+P+V+E+V+R+A+L+A+K+E+R+Q+K+K+D+N+H+L+I+E+R+R+R+F+N+I+N+D+R+I+K+E+L+G+T+L+I+P+K+S+N+D+P+M+R+W+N+K+G+T+I+L+K+S+V+D+Y+I
F.rubripes-m ...S+I+M+H+M+L+D+K+S+G+K+K+F+D+T+V+Q+R+P+G+P+V+E+V+R+A+L+A+K+E+R+Q+K+K+D+N+H+L+I+E+R+R+R+F+N+I+N+D+R+I+K+E+L+G+T+L+I+P+K+S+N+D+P+M+R+W+N+K+G+T+I+L+K+S+V+D+Y+I
T.nigroviridis-m ...S+I+M+H+M+L+D+K+S+G+K+K+F+D+T+V+Q+R+P+G+P+V+E+V+R+A+L+A+K+E+R+Q+K+K+D+N+H+L+I+E+R+R+R+F+N+I+N+D+R+I+K+E+L+G+T+L+I+P+K+S+N+D+P+M+R+W+N+K+G+T+I+L+K+S+V+D+Y+I
D.erio-m ...S+I+M+H+M+L+D+K+S+G+K+K+F+D+T+V+Q+R+P+G+P+V+E+V+R+A+L+A+K+E+R+Q+K+K+D+N+H+L+I+E+R+R+R+F+N+I+N+D+R+I+K+E+L+G+T+L+I+P+K+S+N+D+P+M+R+W+N+K+G+T+I+L+K+S+V+D+Y+I
H.sapiens ...S+I+M+H+M+L+D+K+S+G+K+K+F+D+T+V+Q+R+P+G+P+V+E+V+R+A+L+A+K+E+R+Q+K+K+D+N+H+L+I+E+R+R+R+F+N+I+N+D+R+I+K+E+L+G+T+L+I+P+K+S+N+D+P+M+R+W+N+K+G+T+I+L+K+S+V+D+Y+I
M.musculus ...S+I+M+H+M+L+D+K+S+G+K+K+F+D+T+V+Q+R+P+G+P+V+E+V+R+A+L+A+K+E+R+Q+K+K+D+N+H+L+I+E+R+R+R+F+N+I+N+D+R+I+K+E+L+G+T+L+I+P+K+S+N+D+P+M+R+W+N+K+G+T+I+L+K+S+V+D+Y+I
G.gallus ...S+I+M+H+M+L+D+K+S+G+K+K+F+D+T+V+Q+R+P+G+P+V+E+V+R+A+L+A+K+E+R+Q+K+K+D+N+H+L+I+E+R+R+R+F+N+I+N+D+R+I+K+E+L+G+T+L+I+P+K+S+N+D+P+M+R+W+N+K+G+T+I+L+K+S+V+D+Y+I
```

```
L L L L
Xiphophorus-b ...R+L+Q+E+R+Q+R+A+K+E+L+N+R+Q+K+L+E+H+R+H+L+L+R+I+O+L+E+L+R+A+R+A+H+G+L+A+I+...+T+A+D+V+G+V+E+L+K+O+E+P+A+L+E+D+Q+O+D+Y+T+L+H+P+H+Q+H+P+A+C+T+P
F.rubripes-b ...R+L+Q+E+R+Q+R+A+K+E+L+N+R+Q+K+L+E+H+R+H+L+L+R+I+O+L+E+L+R+A+R+A+H+G+L+A+I+...+T+A+D+V+G+V+E+L+K+O+E+P+A+L+E+D+Q+O+D+Y+T+L+H+P+H+Q+H+P+A+C+T+P
T.nigroviridis-b ...R+L+Q+E+R+Q+R+A+K+E+L+N+R+Q+K+L+E+H+R+H+L+L+R+I+O+L+E+L+R+A+R+A+H+G+L+A+I+...+T+A+D+V+G+V+E+L+K+O+E+P+A+L+E+D+Q+O+D+Y+T+L+H+P+H+Q+H+P+A+C+T+P
D.erio-b ...R+L+Q+E+R+Q+R+A+K+E+L+N+R+Q+K+L+E+H+R+H+L+L+R+I+O+L+E+L+R+A+R+A+H+G+L+A+I+...+T+A+D+V+G+V+E+L+K+O+E+P+A+L+E+D+Q+O+D+Y+T+L+H+P+H+Q+H+P+A+C+T+P
Xiphophorus-m ...R+L+Q+E+R+Q+R+A+K+E+L+N+R+Q+K+L+E+H+R+H+L+L+R+I+O+L+E+L+R+A+R+A+H+G+L+A+I+...+T+A+D+V+G+V+E+L+K+O+E+P+A+L+E+D+Q+O+D+Y+T+L+H+P+H+Q+H+P+A+C+T+P
F.rubripes-m ...R+L+Q+E+R+Q+R+A+K+E+L+N+R+Q+K+L+E+H+R+H+L+L+R+I+O+L+E+L+R+A+R+A+H+G+L+A+I+...+T+A+D+V+G+V+E+L+K+O+E+P+A+L+E+D+Q+O+D+Y+T+L+H+P+H+Q+H+P+A+C+T+P
T.nigroviridis-m ...R+L+Q+E+R+Q+R+A+K+E+L+N+R+Q+K+L+E+H+R+H+L+L+R+I+O+L+E+L+R+A+R+A+H+G+L+A+I+...+T+A+D+V+G+V+E+L+K+O+E+P+A+L+E+D+Q+O+D+Y+T+L+H+P+H+Q+H+P+A+C+T+P
D.erio-m ...R+L+Q+E+R+Q+R+A+K+E+L+N+R+Q+K+L+E+H+R+H+L+L+R+I+O+L+E+L+R+A+R+A+H+G+L+A+I+...+T+A+D+V+G+V+E+L+K+O+E+P+A+L+E+D+Q+O+D+Y+T+L+H+P+H+Q+H+P+A+C+T+P
H.sapiens ...R+L+Q+E+R+Q+R+A+K+E+L+N+R+Q+K+L+E+H+R+H+L+L+R+I+O+L+E+L+R+A+R+A+H+G+L+A+I+...+T+A+D+V+G+V+E+L+K+O+E+P+A+L+E+D+Q+O+D+Y+T+L+H+P+H+Q+H+P+A+C+T+P
M.musculus ...R+L+Q+E+R+Q+R+A+K+E+L+N+R+Q+K+L+E+H+R+H+L+L+R+I+O+L+E+L+R+A+R+A+H+G+L+A+I+...+T+A+D+V+G+V+E+L+K+O+E+P+A+L+E+D+Q+O+D+Y+T+L+H+P+H+Q+H+P+A+C+T+P
G.gallus ...R+L+Q+E+R+Q+R+A+K+E+L+N+R+Q+K+L+E+H+R+H+L+L+R+I+O+L+E+L+R+A+R+A+H+G+L+A+I+...+T+A+D+V+G+V+E+L+K+O+E+P+A+L+E+D+Q+O+D+Y+T+L+H+P+H+Q+H+P+A+C+T+P
```

```
Xiphophorus-b ...E+P+S+L+H+L+T+E+G+H+S+N+P+P+D+G+H+Y+G+S+V+H+G+K+G+S+K+L+N+D+I+L+M+D+N+T+L+S+P+V+R+G+D+L+S+S+V+S+P+D+S+K+S+S+R+K+S+S+V+S+M+D+N+E+R+G+C+...
F.rubripes-b ...E+P+S+L+H+L+T+E+G+H+S+N+P+P+D+G+H+Y+G+S+V+H+G+K+G+S+K+L+N+D+I+L+M+D+N+T+L+S+P+V+R+G+D+L+S+S+V+S+P+D+S+K+S+S+R+K+S+S+V+S+M+D+N+E+R+G+C+...
T.nigroviridis-b ...E+P+S+L+H+L+T+E+G+H+S+N+P+P+D+G+H+Y+G+S+V+H+G+K+G+S+K+L+N+D+I+L+M+D+N+T+L+S+P+V+R+G+D+L+S+S+V+S+P+D+S+K+S+S+R+K+S+S+V+S+M+D+N+E+R+G+C+...
D.erio-b ...E+P+S+L+H+L+T+E+G+H+S+N+P+P+D+G+H+Y+G+S+V+H+G+K+G+S+K+L+N+D+I+L+M+D+N+T+L+S+P+V+R+G+D+L+S+S+V+S+P+D+S+K+S+S+R+K+S+S+V+S+M+D+N+E+R+G+C+...
Xiphophorus-m ...L+N+N+G+L+T+T+D+H+N+P+A+D+...+A+G+D+...+A+R+Y+G+N+G+R+...+K+K+L+V+R+D+S+...+L+S+P+S+P+S+D+L+S+S+M+S+P+D+S+H+P+A+S+R+H+G+S+S+M+S+E+K+D+H+G+C+...
F.rubripes-m ...L+N+N+G+L+T+T+D+H+N+P+A+D+...+A+G+D+...+A+R+Y+G+N+G+R+...+K+K+L+V+R+D+S+...+L+S+P+S+P+S+D+L+S+S+M+S+P+D+S+H+P+A+S+R+H+G+S+S+M+S+E+K+D+H+G+C+...
T.nigroviridis-m ...L+N+N+G+L+T+T+D+H+N+P+A+D+...+A+G+D+...+A+R+Y+G+N+G+R+...+K+K+L+V+R+D+S+...+L+S+P+S+P+S+D+L+S+S+M+S+P+D+S+H+P+A+S+R+H+G+S+S+M+S+E+K+D+H+G+C+...
D.erio-m ...L+N+N+G+L+T+T+D+H+N+P+A+D+...+A+G+D+...+A+R+Y+G+N+G+R+...+K+K+L+V+R+D+S+...+L+S+P+S+P+S+D+L+S+S+M+S+P+D+S+H+P+A+S+R+H+G+S+S+M+S+E+K+D+H+G+C+...
H.sapiens ...L+D+G+L+T+T+N+N+L+G+T+P+A+N+Q+Y+S+P+P+K+M+S+N+L+...+E+D+I+L+M+D+N+T+L+S+P+V+T+D+L+S+S+V+S+P+G+S+K+S+S+R+S+S+S+M+S+A+B+E+T+H+A+C+...
M.musculus ...L+D+G+L+T+T+N+N+L+G+T+P+A+N+Q+Y+S+P+P+K+M+S+N+L+...+E+D+I+L+M+D+N+T+L+S+P+V+T+D+L+S+S+V+S+P+G+S+K+S+S+R+S+S+S+M+S+A+B+E+T+H+A+C+...
G.gallus ...L+D+G+L+T+T+D+N+L+G+N+V+T+P+T+G+Y+S+V+P+A+K+M+S+K+L+...+E+D+I+L+M+D+N+T+L+S+P+V+T+D+L+S+S+V+S+P+G+S+K+S+S+R+S+S+S+M+S+E+D+T+H+A+C+...
```

Abbildung 4.1.4: Vergleich von Vertebraten MITF Proteinen. Die Translationsprodukte von Fisch *mitf* Genen werden mit anderen Vertebraten MITFs verglichen. Identische Sequenzabschnitte sind schwarz, konservierte Aminosäureaustausche sind grau unterlegt. (veränderte Abb. aus Altschmied et al., 2002, zusätzlich eingezeichnete Aminosäuren im Exon 1 von *Xiphophorus-b*)

Die Aminosäuresequenzen beider *Xiphophorus* Proteine zeigen die gleichen Merkmale wie die entsprechenden Sequenzen in höheren Vertebraten. Auch im Bereich der DNA-Bindedomäne, sowie das direkt an die HLH-Region anschließende Leuzinzipper-Motiv (LLLL), welches als Dimerisierungsdomäne dient, und die Sequenzen der acidic activation domain (aad) sind in der Evolution hochkonserviert. Wie die Abbildung 4.1.4 zeigt, weisen auch einige Exons eine starke Konservierung auf. Das in XMitf-M auftretende Exon 1m ist bis auf eine Aminosäure bei allen Spezies identisch, und ist daher spezifisch für M-Formen. Diese starke Konservierung der Exon 1m-Sequenz weist auf eine konservierte Funktion dieses Exons hin. Das Protein XMitf-M ist gerade durch dieses Exon 1m auch näher verwandt mit den Mitf-m Protein-Isoformen von Säugern und Vögeln als mit XMitf-B, das durch Exon 1a und 1b kodierte Sequenzen enthält und daher mit der Mitf-a Isoform höherer Vertebraten assoziiert ist. Nur gering konserviert dagegen ist die Region nahe des C-Terminus, also der Sequenzbereich C-terminal des Leuzinzippers, der bei Säugern sehr Threonin-reich ist, aber nur ein geringe Transaktivierungseigenschaft besitzt. Die vergleichenden Strukturanalysen zeigten außerdem, dass Exon 3 bei Vögeln und Säugern vorhanden ist, nicht aber bei den Knochenfischen, während Exon 5b in beiden Fischgenen *mitf-b* und *mitf-m* gefunden wurde, nicht aber im *mitf* Gen der höheren Vertebraten (Altschmied et al., 2002).

## 4.1.2 Charakterisierung von XMitf-M

### 4.1.2.1 Analyse von XMitf-M nach transienter Expression in *Xiphophorus* Melanomzellen

Es sollten genauere Angaben über charakteristische Daten wie die molekulare Größe des Proteins Mitf gewonnen werden bzw. über Transfektionen gezeigt werden, ob die aus der Aminosäuresequenz vorhergesagte Größe auch tatsächlich mit dem experimentell nachgewiesenen Molekulargewicht übereinstimmt.

Um die in PSM Zellen vorkommende Proteinvariante Mitf-M in Western Blot Analysen nachzuweisen, wurden die Membranen mittels eines Mitf-Antikörpers detektiert. Dieser Antikörper stellte sich in den Experimenten als zu unspezifisch für die Detektion des Fischproteins heraus.

Deshalb wurden transiente Transfektionen eines Expressionsplasmids für die M-Isoform des *Xiphophorus* Mitf durchgeführt, sowie die mutierte Expressionskonstruktversion XMitf-Mmut transfiziert. Beide Expressionsplasmide waren mit einem myc-tag versehen, was eine Detektion des exprimierten Proteins auf der Western Blot Membran mittels eines myc-Antikörpers ermöglichte.

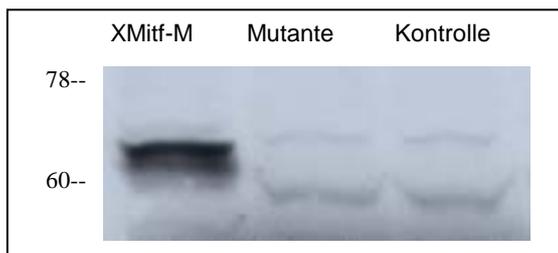


Abbildung 4.1.5: Western Blot mit PSM Extrakten, transfiziert mit XMitf-M, XMitf-Mmut und untransfizierter Kontrolle; Markerangaben in kD

Als Kontrolle wurde Extrakt aus untransfizierten Zellen eingesetzt. Wie erwartet zeigten sowohl das nicht-funktionstüchtige Konstrukt XMitf-Mmut (durch Punktmutation kommt es zu einer Verschiebung des Leserasters, siehe auch 3.1.9.2), wie auch die Kontrolle keine Bande. Das eingebrachte Plasmid dagegen, exprimiert, im Western Blot deutlich erkennbar, sehr stark Mitf-M. Die Größe des Proteins liegt bei ca. 65 kD. Dieses Molekulargewicht

liegt über den vorhergesagten ca. 46 kD (XMitf-M: 402 Aminosäuren, aa, wobei 1 aa = 110 Da; myc-tag mit etwa 25 aa), was auf eine post-translationale Modifizierung des Proteins hindeutet.

#### 4.1.2.2 Analyse von XMitf-M nach transienter Expression in Säugerzellen

Für Co-Transfektionsexperimente (siehe 4.2.3.2) sollte sichergestellt werden, dass *Xiphophorus* Mitf-M auch in Säugerzellen korrekt exprimiert wird. Daher wurde versucht auch in anderen, nicht-*Xiphophorus*-Zellsystemen die Expression von ektopisch eingebrachtem XMitf-M nachzuweisen. Es wurde die humane Zelllinie 293T transient mit dem Konstrukt XMitf-M transfiziert und die Expression des Proteins in einem Western Blot analysiert. Als Kontrolle wurde Extrakt aus nicht-transfizierten 293T Zellen eingesetzt.

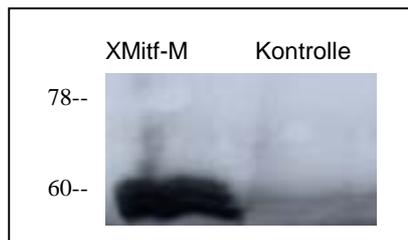


Abbildung 4.1.6: Western Blot mit 293T Extrakten, transfiziert mit XMitf-M, und untransfizierter Kontrolle; Markerangaben in kD

Der Western Blot zeigt deutlich die Expression des Fischproteins Mitf-M auch in den humanen Fibroblasten, während der untransfizierte Kontrollzellextrakt erwartungsgemäß keine mit anti-myc detektierbare Bande aufweist.

In weiteren Experimenten wurde die Mauszelllinie NIH 3T3 Hm, transient mit XMitf-M transfiziert und das exprimierte Protein im Western Blot wiederum mit anti-myc detektiert.

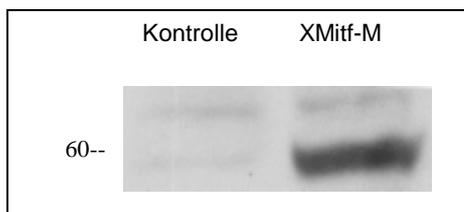


Abbildung 4.1.7: Western Blot: NIH 3T3 Zellen, transfiziert mit XMitf-M und mittels anti-myc detektiert; untransfizierte Kontrolle; Markerangaben in kD

Auch in Mauszellen mittels eines Expressionsplasmids ektopisch eingebrachtes XMitf-M wird exprimiert und ließ sich gut detektieren. Hier zeigt das Protein außerdem das gleiche Molekulargewicht wie in den Fischzellen (Abbildung 4.1.5) oder in den humanen Zellen (Abbildung 4.1.6). Die Modifikationen, die sich von den post-translationalen Veränderungen in PSM Zellen zwar durchaus unterscheiden können, ergeben in Säugerzellen ein Protein des gleichen Molekulargewichts wie in den Fischzellen.

In weiteren Experimenten wurde die Fibroblastenzelllinie außer mit dem *Xiphophorus* Mitf-M Expressionskonstrukt auch mit einem Plasmid für die Expression eines MausMitfs transient transfiziert. Das durch dieses Expressionsplasmid zu exprimierende Protein ist HA-getagt, und dadurch im Western Blot durch einen HA-Antikörper detektierbar.

Die Western Blot Membran war mittels des myc-Antikörpers detektiert worden, und wurde anschließend einem Röntgenfilm exponiert.

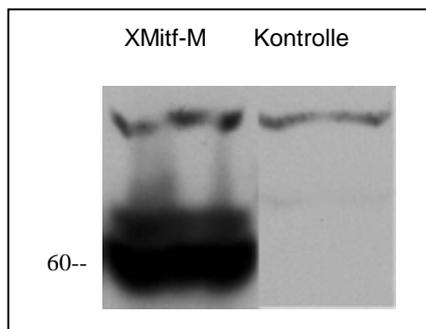


Abbildung 4.1.8: Western Blot: 293T Zellen, transfiziert mit myc-getagtem XMitf-M bzw. Extrakt aus untransfizierten Zellen als Kontrolle und mittels anti-myc detektiert; Markerangaben in kD

Die Membran wurde dann „gestrippt“ um eine erneute Detektion mittels eines weiteren Antikörpers, in diesem Fall Anti-HA, zu ermöglichen.

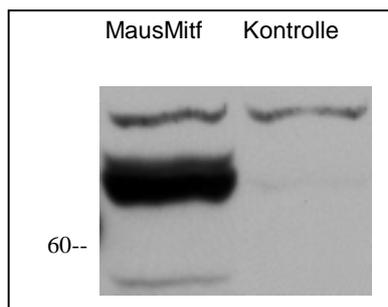


Abbildung 4.1.9: Western Blot: 293T Zellen, transfiziert mit HA-getagtem MausMitf bzw. untransfizierter Zellextrakt als Kontrolle und mittels anti-HA detektiert; Markerangaben in kD

Abbildung 4.1.10 zeigt eine Überlagerung beider Autoradiographien, um einen direkten Vergleich der beiden Mitf Proteine möglich zu machen.

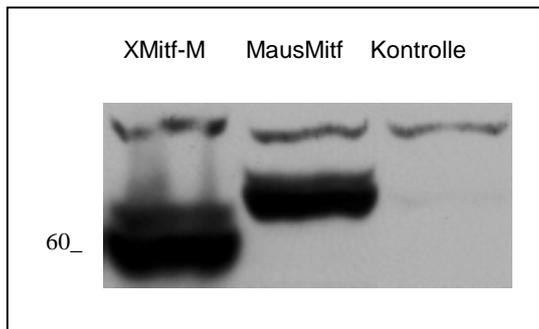


Abbildung 4.1.10: Zwei übereinandergelegte Western Blot Röntgenfilme; 293T Zellen, transfiziert mit XMitf-M und mittels anti-myc detektiert; transfiziert mit MausMitf und mittels anti-HA detektiert; untransfizierte Kontrolle; Markerangaben in kD

Während sich für die Fischproteinbande ein Molekulargewicht von ca. 60-65 kD ablesen lässt, zeigt das MausMitf ein höheres Molekulargewicht von ungefähr 70 kD. Diese experimentell nachgewiesenen Molekulargewichte liegen beide wie vorher bereits für XMitf-M in Fischzellen gezeigt, über der durch die Aminosäuresequenz vorhergesagten/erwarteten Größe. Dies ist allerdings durch mögliche post-translationale Modifikationen der Proteine zu erklären.

## **4.2 Untersuchungen zur melanomspezifischen Transkriptionsaktivierung in *Xiphophorus***

### **4.2.1 Identifizierung melanomspezifischer cis-regulatorischer Bereiche im Tyrosinasepromotor von Medaka (*Oryzias latipes*)**

Um die transkriptionellen Eigenschaften des Tyrosinasegenpromotors von Medaka (*Oryzias latipes*) zu analysieren, wurden Reporter-gen-Experimente durchgeführt. Hierfür wurden 3,2 kb der 5' flankierenden Region des Tyrosinasegens mit dem Reporter-gen LUC+ verbunden. Dieses 3,2 kb große Fragment besitzt drei mutmaßliche Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Mitf, im weiteren benannt als Bindungsstelle A, die nahe der Basalpromotorregion liegt (-126/-131), sowie die zwei weiter 5' liegenden Bindungsstellen B (-2651/-2656) und C (-2866/-2871).

Es wurden transiente Transfektionsanalysen durchgeführt worden, wobei das komplette Promotorfragment, sowie verschiedene 5' Deletionen als Konstrukte mit dem Luciferasegen in PSM und A2 Zellen transfiziert und zur Expression gebracht wurden.

Diese Experimente, auf deren Ergebnissen spätere Versuche aufbauen, waren von PD Dr. Joachim Altschmied und Jutta Duschl durchgeführt worden und hatten gezeigt, dass die Aktivitäten der unterschiedlichen Promotorfragmente in PSM Zellen, nicht jedoch in A2 Zellen, mit der Präsenz bzw. der Anzahl der mutmaßlichen Bindungsstellen für Mitf korrelierten. Generell ließ sich feststellen, dass alle Konstrukte in den Melanomzellen (PSM) aktiv waren, wobei das längste Promotorfragment die höchste Luciferaseaktivität zeigte. Eine Deletion des distalen 2,3 kb Fragments mit den mutmaßlichen Bindungsstellen C und B führte zu einem starken Rückgang der transkriptionellen Aktivität. Eine weitere Deletion von ungefähr 600 bp zeigte gleichbleibende Aktivität. Ein Konstrukt allerdings bei dem auch die letzte E-Box (Mitf-Bindungsstelle A) deletiert war, wies eine ca. 10fache Reduktion der Aktivität auf. Da jedoch diese 82 bp upstream Sequenz ausreichte um meßbare Reporter-genaktivität nachzuweisen, wurde

dieses Konstrukt (Tyr -82) als Minimalpromotorkonstrukt bezeichnet und als Referenzwert in den Transfektionsexperimenten eingesetzt.

Im Gegensatz dazu zeigten alle Konstrukte in der embryonalen, nicht-Melanomzelllinie A2 eine dem Minimalpromotor ähnlich niedrige Aktivität, die auch durch Vorhandensein von mutmaßlichen Mitf-Bindungsstellen im Promotorkonstrukt nur maximal eine 2fache Erhöhung erfuhr. Da dagegen in den PSM Zellen die maximale Aktivität des Promotors ca. 100fach stärker war als die des Minimalpromotors (Tyr -82), scheint der Tyrosinasegenpromotor positiv wirkende, melanomspezifische transkriptionelle regulatorische Elemente zu besitzen.

Um die Rolle dieser Sequenzelemente genauer zu untersuchen waren weitere Transfektionsexperimente durchgeführt worden. Durch diese Experimente sollte eine Eingrenzung der genannten regulatorischen Elemente erreicht werden. Die relativen Positionen der einzelnen E-Boxen im Tyrosinasepromotor zueinander waren durch Inversion bzw. Deletion großer Promotorabschnitte verändert worden.

Diese Untersuchungen von PD Dr. Joachim Altschmied und Jutta Duschl hatten ergeben, dass auch Umorganisationen innerhalb des Promotors, die die Sequenzintegrität der Mitf-Bindungsstellen nicht beeinträchtigten, nicht die hohe transkriptionelle Aktivität der unterschiedlichen Konstrukte veränderten. Die Konstrukte, bei denen ein distales 2,3 kb Fragment in der Orientierung gedreht wurde, oder bei denen ein 1,5 kb großes Fragment deletiert worden war, zeigten im Vergleich mit dem Minimalpromotor bis zu 200fache Erhöhung der Aktivitätswerte. In der embryonalen Zelllinie A2 dagegen fand maximal eine 3fache Erhöhung der Aktivierung statt. Das deutete daraufhin, dass die Bereiche mit den Mitf-Bindungsstellen notwendig für eine zelltypspezifische transkriptionelle Aktivierung sind.

#### 4.2.2 Analyse potentieller Bindungsstellen für Mitf

Da aus den bisherigen Transfektionsergebnissen geschlossen werden konnte, dass die Regionen mit den mutmaßlichen Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Mitf maßgeblich an einer Erhöhung der Transkriptionsaktivierung des Medaka Tyrosinasepromotors beteiligt sind, sollten die drei Mitf-Bindungsstellen genauer auf ihre Funktionalität, aber auch auf ihre Proteinbindungskapazität hin untersucht werden. Um Aussagen über DNA/Protein-Interaktionen machen zu können, wurden „Electrophoretic Mobility Shift Assays“ (EMSA) durchgeführt. Mittels transienter Transfektionsexperimente sollte die direkte Rolle der Mitf-Bindungsstellen in der zelltypspezifischen Transkriptionsaktivierung untersucht werden.

##### 4.2.2.1 Nachweis von DNA/Protein Komplexen mittels EMSA

In den EMSA-Experimenten wurden entsprechende Oligonukleotide (siehe auch 2.4) für die Bindungsstellen, bzw. mutierte Oligonukleotidsequenzen, in denen in der 6 bp langen Kernsequenz der E-Box Basen ausgetauscht wurden, mit Proteinextrakten aus PSM Zellkernen auf Interaktionen untersucht.

(A)

<b>A wt:</b>	-143 TATTATCCTGAGCATGTGATGCTCATATTA	-114
<b>A mut:</b>	-143 TATTATCCTGAGgAatTcATGCTCATATTA	-114
<b>B wt:</b>	-2668 TGGCAACAGCAGCATGTGACTAGCCTGTGA	-2639
<b>B mut:</b>	-2668 TGGCAACAGCAGgAatTcACTAGCCTGTGA	-2639
<b>C wt:</b>	-2854 CATTCTTGCGTCCATGTGACATTATGTAAA	-2883
<b>C mut:</b>	-2854 CATTCTTGCGTCgAatTcACATTATGTAAA	-2883

(B)



Abbildung 4.2.1: Interaktionen der E-Boxen des Medaka Tyrosinasegenpromotors und PSM Zellkernproteinextrakten

(A) Sequenzen der im EMSA eingesetzten Oligonukleotide. Die Einzelstrang-Sequenzen sind in 5'→3' Richtung angegeben. Ihre Positionen im Promotor sind aufgezeigt, die E-Boxen sind unterstrichen und die ausgetauschten Basen in den mutanten Oligos mit Kleinbuchstaben dargestellt. Die doppelsträngigen Sequenzen haben HindIII kompatible Überhänge für Klonierung und radioaktive Markierung.

(B) EMSA mit PSM Kernproteinextrakten und den E-Box-Oligonukleotiden. Die Sternchen markieren den DNA/Proteinkomplex, der mit allen drei E-Box-Proben gebildet wird.

Wie Abbildung 4.2.1 zeigt, wurden mit dem Kernproteinextrakt aus PSM Zellen und den Oligonukleotid-Proben deutlich erkennbare DNA/Protein-Komplexe gebildet. Mit allen drei wildtypischen E-Box-Sequenzen formte sich ein Komplex gleicher Mobilität, der dagegen mit den mutierten Oligosequenzen nicht auftrat. Dass die E-Box zur Bildung der beobachteten DNA/b-HLH-Protein-Komplexe benötigt wird, konnte aus zwei Befunden geschlossen werden. Ein Befund der dies zeigte, ist das offensichtliche Unvermögen der mutierten Bindungsstellen diese in der Abbildung mit Sternchen markierten Komplexe zu bilden. Zusätzlich weißt die sehr geringe Sequenzkonservierung der drei wildtypischen Oligosequenz-Proben außerhalb der E-Box, daraufhin, dass eine intakte E-Box Sequenz zur Bildung der beobachteten DNA/b-HLH-Protein-Komplexe benötigt wird.

Da die E-Box das zentrale Motiv für die Bindung von b-HLH-Leuzinzipper-Proteinen ist, ist es also wahrscheinlich ein Protein aus dieser Familie das

mit den Oligosequenzen jeweils diesen Komplex formt. Mit der mutierten Oligonukleotidsequenz Cmut war eine weitere, aber sich deutlich von der bei den wildtypischen Proben auftretenden, unterscheidende Bande sichtbar. Bei dieser erkennbaren Bande muß es sich um einen DNA/Protein-Komplex handeln, der durch Proteine, die außerhalb der eigentlichen E-Box Bindungsstelle binden, geformt wurde. Für diese Komplexbildung kommt also nur ein Protein in Frage, das keine intakte E-Box Sequenz für die Bindung benötigt, somit kein Mitglied der b-HLH-Zip Protein Familie sein kann.

#### **4.2.2.2 Funktion der Mitf-Bindungsstellen im Medaka Tyrosinasepromotor für die melanomspezifische Transkriptionsaktivierung**

Um festzustellen, ob die E-Boxen wichtige funktionelle *cis* regulatorische Elemente darstellen, wurden sie bezüglich ihres Einflusses auf die Aktivität des homologen, und eines heterologen Promotors untersucht. Hierfür wurden Reportergenkonstrukte konstruiert, in welchen die zwei distalen E-Boxen in Form von 35 bp langen Oligosequenzen, entweder einzeln oder in Kombination vor den verkürzten Medaka Tyrosinasepromotor, der die Mitf-Bindungsstelle A bzw. die mutierte E-Box Amut enthält, gesetzt wurden.

Die Aktivität dieser Promotorkonstrukte wurde wiederum in transienten Transfektionen der *Xiphophorus* Zelllinien PSM und A2 untersucht.

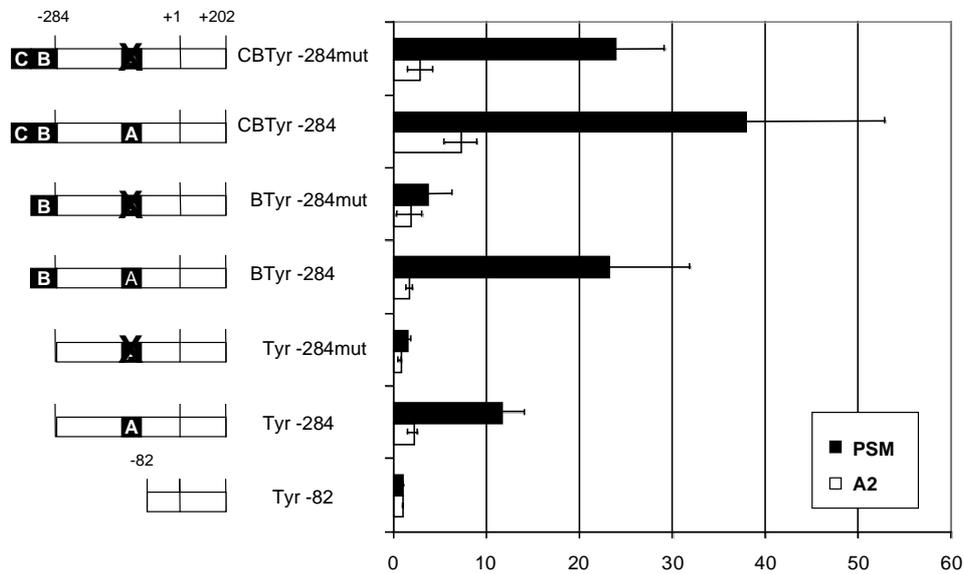


Abbildung 4.2.2: Einfluß der E-Boxen auf die Aktivität des Tyrosinasegenpromotors. Die mutmaßlichen Mitf-Bindungsstellen, die E-Boxen B und C wurden vor das Konstrukt mit E-Box A (Tyr -284) bzw. das entsprechende Konstrukt mit mutierter A-Bindungsstelle (Tyr -284mut) gesetzt und PSM bzw. A2 Zellen damit transfiziert. Gezeigt wird die relative Expression (Mittelwerte aus 6 unabhängigen Transfektionsexperimenten mit Standardfehler), die auf Tyr -82, dessen Luciferasewert zu 1 gesetzt wurde, bezogen.

Diese Experimente zeigten deutlich dass die Präsenz der Mitf-Bindungsstelle A im Basalpromotor (Tyr -284) dessen transkriptionelle Aktivität in Melanomzellen verstärkt. Dieser Effekt der Erhöhung der transkriptionellen Aktivierung ist der E-Box-Sequenz zuzuschreiben, da das Reporterplasmid mit der mutierte Bindungsstelle A, in der vier Basen innerhalb dieser Sequenz verändert wurden (Tyr -284mut), die Promotorstärke auf Minimalpromotorlevel verringert. Das wiederum führt zusammen mit den EMSA Ergebnissen, die zeigten, dass die mutierten E-Box-Sequenzen in vitro keine

Proteinbindung erlauben, zu der Schlussfolgerung, dass die Bindungsstelle Amut eine wirklich nicht-funktionstüchtige Mitf-Bindungsstelle ist.

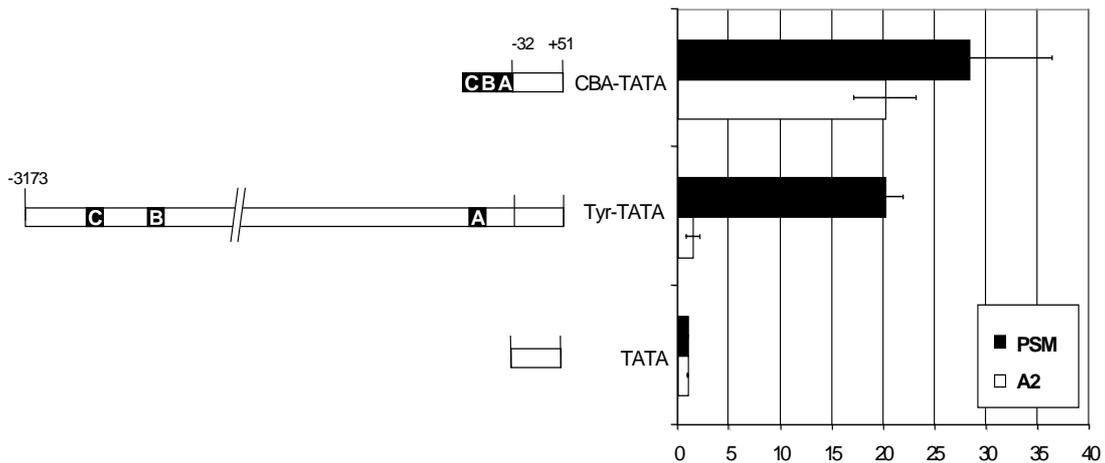
Die direkt 5´ vor den Basalpromotor (Tyr -284) klonierte Bindungsstelle B alleine, oder in Kombination mit der Mitf-Bindungsstelle C, erhöhte zwar die Aktivität der Luciferase in den PSM Zellen, aber nur die Kombination von beiden Elementen konnte eine Mutation im proximalen Element, der mutierten Bindungsstelle Amut ausgleichen. Zwei intakte Mitf-Bindungsstellen im Promotor scheinen somit für eine starke transkriptionelle Aktivierung in der Melanomzelllinie PSM auszureichen. Dieser Effekt scheint außerdem unabhängig von der Position dieser zwei Bindungsstellen im Promotor zu sein.

Es ist festzustellen, dass die Plasmidkonfiguration mit allen drei wildtypischen Mitf-Bindungsstellen (CBTyr -284) einen zwar geringen, aber signifikanten positiven Effekt auf die Transkription auch in nicht-Melanomzellen (A2) zeigte. (Vergleich zwischen den relativen Luciferaseaktivitäten der Konstrukte Tyr -284 und CBTyr -284: Alternate Welch t test: considered significant)

Festzuhalten bleibt aber auch dass der Level der transkriptionellen Aktivierung in der Melanomzelllinie PSM auch in Anwesenheit aller drei Bindungsstellen (CBTyr -284) niedriger war als mit dem kompletten Tyrosinasegenpromotor-Konstrukt Tyr -3173 (ca. 40fache Erhöhung gegenüber ca. 100facher Erhöhung bezogen auf den Minimalpromotor Tyr -82). Dies zeigt, dass die Bindungsstellen sehr wichtig für die Promotoraktivität sind, es gibt aber auch einen Hinweis darauf, dass Bereiche, die zwischen den E-Boxen liegen, zusätzlich verstärkende Funktion zu haben scheinen.

Nachdem bewiesen werden konnte, dass die E-Boxen B und C wichtig bzw. A sogar essentiell für die Promotoraktivität sind, sollte nun geklärt werden, ob die Bindungsstellen alleine ausreichend für pigmentzellspezifische transkriptionelle Aktivierung sind. Hierzu wurden verschiedene Konstrukte vor einen heterologen Minimalpromotor, nämlich den Promotor des Thymidinkinasegens des Herpes Simplex Viruses (HSV), kloniert. Dieser Minimalpromotor ist eine Deletionsmutante des HSV-tk-Promotors, besitzt als

einziges funktionelles Element eine TATA-Box, und wurde aus diesem Grund



in den folgenden Experimenten mit TATA bezeichnet.

Abbildung 4.2.3: Einfluß isolierter E-Boxen auf die Promotoraktivität und -spezifität. Die upstream Region des Medaka Tyrosinasegens von -3173 bis -82, sowie eine Kombination aller drei einzelnen E-Boxen waren jeweils vor einen HSV-tk-Minimalpromotor (TATA) kloniert worden. Es wurden Transfektionen in PSM bzw. A2 Zellen durchgeführt. Als Referenzwert wurden die zu 1 gesetzten Luciferasewert des Minimalpromotorkonstrukts TATA herangezogen. Gezeigt wird die relative Expression (Mittelwerte aus 5 unabhängigen Transfektionsexperimenten mit Standardfehler).

Beide Plasmide, der künstliche Promotor CBA-TATA mit den aneinandergereihten Mitf-Bindungsstellen, aber auch das Konstrukt mit dem langen Tyrosinasepromotorfragment vor den tk-Minimalpromotor gesetzt, aktivierten sehr stark die Transkription. Allerdings fällt auf, dass die Gewebespezifität bei dem CBA-TATA Konstrukt verloren ging, während das längere Konstrukt, das alle Elemente außer dem Tyrosinase-Minimalpromotor besitzt, in der Lage war sowohl Aktivität wie auch Melanomspezifität auf den heterologen Promotor zu übertragen. Die drei

einzelnen Bindungsstellen alleine reichen also nicht aus um Zellspezifität zu vermitteln, es scheinen zusätzliche Elemente im Promotor hierfür nötig zu sein.

#### **4.2.3 Einfluß des Transkriptionsfaktors Mitf-M auf den Medaka Tyrosinasegenpromotor**

Die Ergebnisse der vorausgegangenen Experimente hatten gezeigt, dass die Mitf-Bindungsstellen eine wichtige Rolle für die Aktivierung des Tyrosinasegenpromotors in Melanomzellen spielen. In Fischen, wie bei Säugetieren, kommt der E-Box-bindende Transkriptionsfaktor Mitf in mehreren Isoformen vor. Die Isoform Mitf-M wird spezifisch in Melanozyten-enhaltenden Geweben exprimiert. hMITF-M konnte beim Menschen in Melanomen nachgewiesen werden, und die Isoform Mitf-M wird auch im Fisch sehr stark in Melanomen, sowie in der Melanomzelllinie PSM exprimiert. Mitf-M aktiviert nachweislich melanozytenspezifische Promotoren. In Melanomzellen scheint Mitf-M deshalb Hauptkandidat für eine transkriptionelle Aktivierung über E-Boxen zu sein. Daher sollte der Einfluß von Mitf-M auf den Tyrosinasegenpromotor von Medaka getestet werden.

##### **4.2.3.1 Coexpression des Tyrosinasepromotors und XMitf-M in *Xiphophorus* Fibroblasten**

Zellen der nicht-Melanomzelllinie A2 von *Xiphophorus*, in denen kein Mitf-M exprimiert wird, wurden mit einem XMitf-M Expressionsplasmid, sowie einem Tyrosinase-Reporterkonstrukt transient transfiziert. Für diese Experimente wurde das Promotorkonstrukt Tyr -3173 herangezogen, da es die natürliche Anordnung der Mitf-Bindungsstellen trägt.

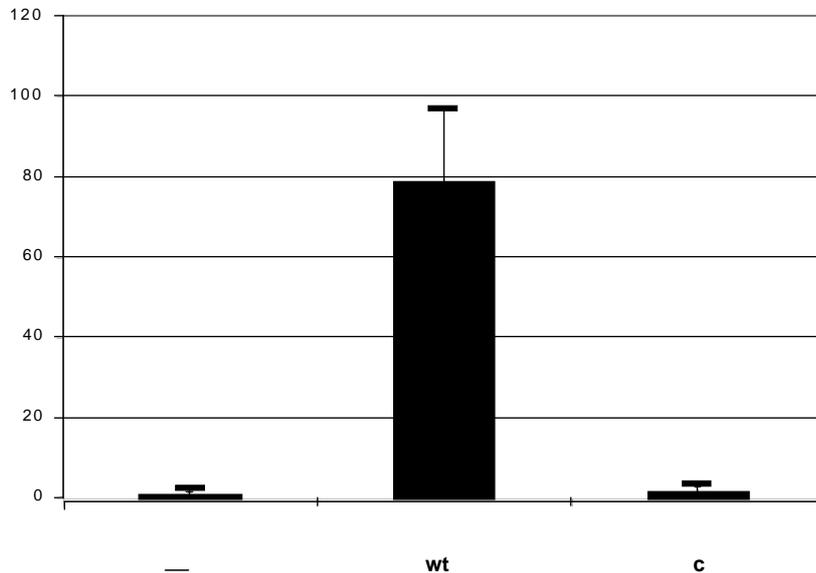


Abbildung 4.2.4: Transaktivierung des Tyrosinasegenpromotors durch ekto­pisch eingebrachtes Mitf-M. A2 Zellen wurden transient co-transfiziert mit dem Konstrukt Tyr -3173 und dem Expressionsplasmid für *Xiphophorus* Mitf-M. (-) kein Mitf (wt) wildtypisches Mitf (c) Kontrollvektor (Erläuterung im Text)

Diese Experimente zeigen, dass der wildtypische Expressionsvektor für *Xiphophorus* Mitf-M (XMitf-M) in transienten Co-Transfektionen den Tyrosinasegenpromotor von Medaka stark aktivieren konnte. Dieses Maß der Aktivierung ist vergleichbar mit dem in PSM Zellen gemessenen Unterschied der relativen Luciferasewerte von Minimal- (Tyr -82) und kompletten Promotorkonstrukt (Tyr -3173). Das mutierte XMitf-M kann aufgrund einer Punktmutation, die zu einer Verschiebung des Leserasters führt, kein funktionelles Mitf exprimieren und diente in diesen Experimenten als Kontrollvektor. Co-Transfektionen mit dem mutierten XMitf-M hatten keinen Effekt auf die Luciferaseaktivität. Das Reporterkonstrukt Tyr -3173 wurde nicht aktiviert, da kein Mitf-M in den Zellen vorhanden ist und auch ekto­pisch aufgrund der Mutation im Expressionsplasmid kein funktionelles Mitf-M eingebracht wurde.



### 4.2.3.2 Coexpression des Tyrosinasepromotors und XMitf-M in Säugerzellen

Um zu überprüfen ob der Effekt von ektopisch eingebrachtem XMitf-M zur Transkriptionsaktivierung auch in Zellkultursystemen anderer Vertebraten nachweisbar ist und man somit auf eine Konservierung regulatorischer Mechanismen in der Evolution schliessen kann, wurden humane Fibroblasten (293T Zellen) in gleicher Weise transient co-transfiziert.

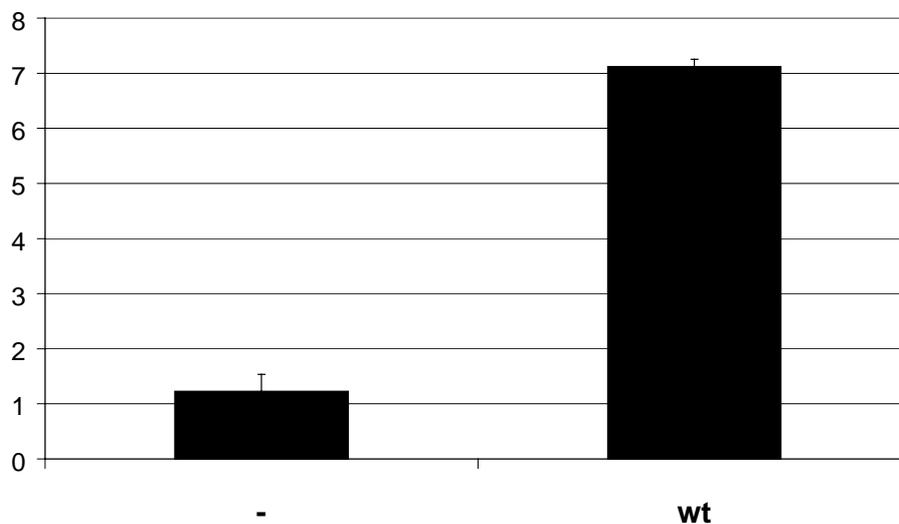


Abbildung 4.2.5: Transaktivierung des Tyrosinasegenpromotors durch ektopisch eingebrachtes Mitf-M. Humane 293T Zellen wurden transient co-transfiziert mit dem Konstrukt Tyr -3173 und dem Expressionsplasmid für *Xiphophorus* Mitf-M. (-) kein Mitf (wt) wildtypisches Mitf

Transfektionen mit dem mutierten Expressionsplasmid wurden hier nicht durchgeführt, da die nicht-Funktionalität von XMitf-Mmut in vorhergehenden Experimenten hinreichend bestätigt worden war. Die Co-Transfektionen mit dem *Xiphophorus* Expressionsvektor XMitf-M und dem Medaka Tyrosinasegenpromotor zeigten auch in der humanen Zelllinie, dass das ektopisch eingebrachte Protein den Promotor aktivieren konnte. XMitf-M aktivierte die Transkription des Reportergens LUC+, wenngleich auch die relative Luciferaseaktivität in der humanen Zelllinie ungefähr 10fach niedriger war als in den Fischzellen.

#### 4.2.4 Untersuchungen zur Rolle von Mitf in der Signaltransduktion

Wie gezeigt werden konnte, ist der Tyrosinasegenpromotor von Medaka in *Xiphophorus* Melanomzellen aktiv. Als wichtig für diese Aktivität stellten sich die E-Boxen im Promotor heraus (siehe 4.2.2). Es kann angenommen werden, dass die Aktivierung des Tyrosinasepromotors von Mitf reguliert wird. Die Aktivität von Mitf-M wiederum wird mittels Phosphorylierung durch die Mitogen-aktivierte Protein(MAP)kinase Erk reguliert (Hemesath et al., 1998; Wu et al., 2000). Hierbei führt die Phosphorylierung und Aktivierung der MAPkinase durch die MAPkinasekinase (MEK) wiederum zu einer Phosphorylierung von Mitf. Für das murine Mitf wurde nachgewiesen dass das Protein an Serin 73 phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung reguliert die transkriptionelle Aktivität von Mitf hoch, läßt also die Transaktivierung des Tyrosinasegenpromotors ansteigen (Hemesath et al., 1998).

Auch im *Xiphophorus* Mitf könnte diese Phosphorylierung an dem homologen Serin stattfinden. Deshalb sollte untersucht werden ob dieser Signalweg über MAPkinase auch in den Fisch-Melanomzellen für die Aktivität des Tyrosinasegenpromotors relevant ist.

Es wurden transiente Transfektionen verschiedener Konstrukte in PSM Zellen unter Zugabe des Inhibitors UO126 (MEK-Inhibitor) durchgeführt. Dieser greift direkt an der MAPkinasekinase (MEK) an und verhindert so die Phosphorylierung und damit die Aktivierung der MAPkinase.

Die Abbildung 4.2.6 zeigt die relative Luciferaseaktivität der transient transfizierten Plasmide in den PSM Zellen. Es wurden die Konstrukte Tyr -284, mit der Mitf-Bindungsstelle A und die Mutante Tyr -284mut, mit der nicht funktionstüchtigen Bindungsstelle A, transfiziert. Die Transfektionen wurden sowohl unter Einfluß des Inhibitors UO126 wie auch ohne Inhibitor durchgeführt. Die aufgetragenen Werte sind die Luciferaseaktivitäten, die auf den zu 1 gesetzten Luciferasewert von Tyr -284mut normiert wurden.

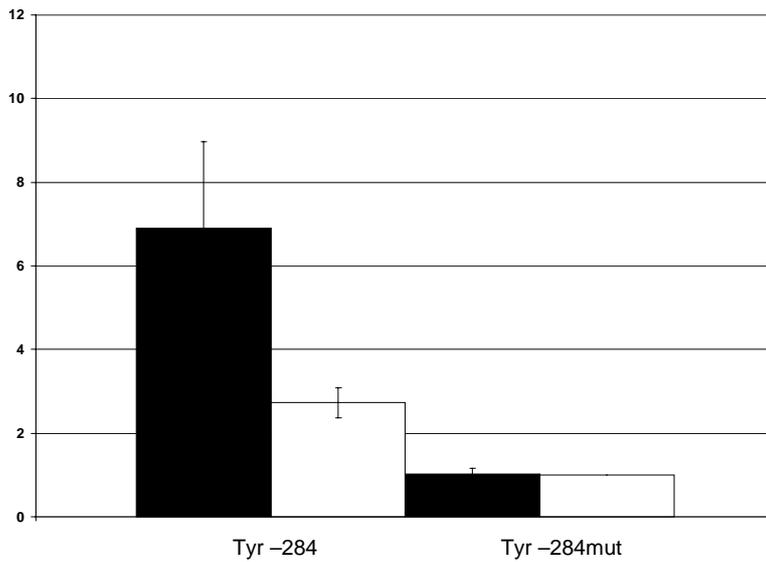


Abbildung 4.2.6: Einfluß des MEK-Inhibitors UO126 auf die Aktivität des Medaka Tyrosinasepromotors. PSM Zellen wurden mit 20  $\mu$ molar Inhibitor (schwarz) oder als Kontrolle ohne Inhibitorzugabe (weiß) behandelt und mit Tyr -284 bzw. Tyr -284mut transfiziert. Die Konstrukte wurden dann auf ihre transkriptionelle Aktivität hin untersucht. Die Werte wurden auf den zu 1 gesetzten Wert von Tyr -284mut normiert.

Der Vergleich der Luciferaseaktivitätswerte des Plasmids Tyr -284 mit bzw. ohne Inhibitor während der Transfektion, zeigt deutlich die Erhöhung der Expression unter Einfluß des Inhibitors. Diese Erhöhung ist offenbar auf die Mitf-Bindungsstelle A zurückzuführen, da ein Vergleich des Konstrukts mit der Mutation innerhalb der Bindungsstelle zwischen den Werten mit und ohne Inhibitoreinfluß keinen Unterschied zeigt. Obwohl der Inhibitor UO126 die Phosphorylierung der MAPKinase und damit die Phosphorylierung von Mitf verhinderte, konnte Mitf das Reporter-gen aktivieren.

## 5 Diskussion

### 5.1 Die Evolution der *mitf* Gene

Bei Säugetieren und Vögeln kodiert ein einziges Gen für mehrere Mitf Proteine mit unterschiedlichen N-Termini. Durch verschiedene Promotoren und Exons kommt es zu unterschiedlichen mRNAs, die für diese Mitf-Isoformen kodieren.

Im Gegensatz zu höheren Vertebraten konnte nachgewiesen werden, dass mindestens zwei individuelle *mitf* Gene in *Xiphophorus*, wie auch in den beiden Kugelfischen *F. rubripes* und *T. nigroviridis* (siehe 4.1.1) existieren (Altschmied et al., 2002). Unterstützt wurden unsere Befunde durch die Daten von Lister et al. (2001), die besagen dass es zwei verschiedene Isoformen für den Transkriptionsfaktor Mitf ebenfalls im Zebrafisch gibt. Für diese Isoformen von Mitf kodieren zwei cDNAs, die sich nicht nur in ihrem 5' End-Exon unterscheiden, sondern über ihre gesamte Länge hinweg Unterschiede aufweisen. Nach Lister et al. sind diese cDNAs aus zwei separaten Genen entstanden. Das ist zum einen das Gen *mitf-a*, das zur Entwicklung von Pigmentzellen, die aus dem Neuralrohr hervorgehen (neural crest derived pigment cells) gebraucht wird, zum anderen *mitf-b*, welches im RPE (retinal pigment epithelium) exprimiert wird und die Funktion von *mitf-a* zwar im Auge ersetzen kann, nicht jedoch in Pigmentzellen.

Zusammen mit den Ergebnissen von Lister et al. weisen unsere Daten auf die Präsenz duplizierter *mitf* Gene in Knochenfischen seit mindestens 100-120 Millionen Jahren hin. Diese Schätzung beruht auf einer konservativen Berechnung der Aufspaltung von Zebrafisch- und *Xiphophorus*/Kugelfisch-Linie. Untermauert wird diese Annahme durch die Tatsache, dass die Fisch-Mitf-m und Mitf-b Proteine zwei individuelle monophyletische Gruppen bilden (Altschmied et al., 2002).

Während einige phylogenetische Analysen eine Duplikation der *mitf* Gene innerhalb der Fischlinie nach der Trennung von der Vogel/Säugetierlinie unterstützen, erlauben es andere Analysen nicht, die relativen Positionen beider Fisch-Mitf-Proteingruppen genauer festzulegen. Eine alternative

Hypothese zu der fischspezifischen Duplikation wäre, dass sich die *mitf* Gene dupliziert haben bevor eine Separation zwischen der Vogel/Säuger- und der Fischlinie stattfand. Während beide Kopien in der Knochenfischlinie erhalten blieben, ging in den höheren Vertebraten ein Duplikat verloren. Die verbliebene Kopie sollte also näher mit entweder dem *mitf-b* oder dem *mitf-m* Fischgenen verwandt sein. Vergleichende Strukturanalysen der Vertebraten-*mitf*-cDNA und genomischer Sequenzen zeigten, dass Intron 3 bei Vögeln und Säugern vorhanden ist, nicht aber bei den Teleostiern, während Intron 5b, in beiden Fischgenen *mitf-b* und *mitf-m* gefunden wurde, nicht aber im *mitf* Gen der höheren Vertebraten (siehe Abb. 4.1.4). Nach der Theorie der Duplikation von *mitf* vor der Separation von Fisch und Vogel/Säuger, müßte Intron 5b bereits vor der Duplikation vorhanden gewesen und bei höheren Vertebraten verloren gegangen sein.

Wenn wir andererseits die Hypothese einer fischspezifischen Duplikation von *mitf* annehmen, könnte Intron 5b in der Fischlinie auch vor der eigentlichen Duplikation dazugekommen sein (Altschmied et al., 2002).

Die Hypothese der fischspezifischen Gen-Duplikation paßt zu der Annahme, dass bei den Knochenfischen im Laufe der Evolution eine gesamte Genom-Duplikation stattgefunden hat, seit sie sich von ihrem letzten gemeinsamen Vorfahren, den sie mit Amphibien, Reptilien, Vögeln und Säugern teilten, abgetrennt hatten (Amores et al., 1998; Meyer und Schartl, 1999; Altschmied et al., 2002). Als Konsequenz daraus gibt es viele Fälle, in denen Fische zwei ähnliche Gene besitzen, während Säuger nur ein Gen haben. Diese Genomduplikation hat wahrscheinlich schon vor 300-450 Millionen Jahren stattgefunden (Van de Peer et al., 2001).

Es konnte der Beweis für zwei unabhängige Gene, die zwei alternativen Transkripten in anderen Vertebratengruppen entsprechen, erbracht werden. Bei dieser sogenannten Subfunktionalisierung werden zwei alternative Transkripte des selben Gens mit unterschiedlichen Funktionen durch zwei individuelle Gene ersetzt (Altschmied et al., 2002). Wie in anderen bisher publizierten Beispielen von Subfunktionalisierung bei Fischgenen, wie z.B. bei den *sox9* Genen (z.B. (Chiang et al., 2001; Serluca et al., 2001)), zeigen auch Fisch *mitf-m* und *mitf-b* unterschiedliche Expressionsmuster während

der Embryonalentwicklung im Zebrafisch (Lister et al., 2001), sowie in adulten Geweben in *Xiphophorus*. Die Subfunktionalisierung der *mitf* Gene bei Fischen konnte mit der Degeneration spezifischer Promotoren und/oder regulatorischer Sequenzen in Zusammenhang gebracht werden. Die Reihenfolge dieser degenerativen Ereignisse muß aber erst noch sicher bestimmt werden. So könnte es sein, dass Mutationen die kodierende Sequenz und/oder die Splicingstelle eines alternativen Exons im Duplikat A verändert haben, nicht aber im Duplikat B. Als Beispiel kann man hier Exon 1m in *mitf-b* nennen. Im Duplikat A wäre dann wohl die Wahl zur Funktionalität des Promotors der die Expression des Transkripts, welches das alternative Exon aktiviert, überflüssig geworden. Andererseits könnten Änderungen von Promotoren oder spezifischen regulatorischen Elementen, die nötig für die Expression eines alternativen Transkripts im Duplikat A, aber nicht im Duplikat B sind, es möglich machen, dass sich im Duplikat A nicht-konservierte Mutationen in Sequenzen, die spezifisch für das alternative Transkript sind, anhäufen (Altschmied et al., 2002).

Um die genomischen Mechanismen und die evolutionäre Signifikanz, die dieser Duplikation der *mitf* Gene im Fischgenom zugrunde liegen, besser verstehen zu können, werden weitere Daten von anderen Fischgenomen benötigt.

## **5.2 Untersuchungen zur melanomspezifischen Transkriptionsaktivierung in *Xiphophorus***

Es konnte gezeigt werden, dass *Mitf* bei Maus und Mensch den Tyrosinasegenpromotor über Bindung an ein E-Box Motiv transaktiviert und so die Genexpression von Tyrosinase, einem an der Melanogenese beteiligten Enzym, reguliert (Bentley et al., 1994; Ferguson und Kidson, 1997). Ebenfalls aus der Literatur war bekannt, dass 270 bp des murinen Tyrosinasepromotors, die ein E-Box Motiv beinhalten, ausreichen, um sowohl in kultivierten Zellen wie auch in transgenen Mäusen eine zelltypspezifische Expression zu garantieren (Ferguson und Kidson, 1997). Um zu untersuchen, ob das Tyrosinasegen von Medaka (*Oryzias latipes*), wie die entsprechenden Gene bei Säugern, von *Mitf* reguliert wird, waren die transkriptionellen Eigenschaften des Tyrosinasegenpromotors genauer analysiert worden. Interessiert hat außerdem die Fragestellung, ob *Mitf* auch in den Melanomzellen von *Xiphophorus* aktiv ist, und die Expression von *Mitf* in Melanomen die Funktion dieses Proteins in gen-regulatorischen Prozessen widerspiegelt.

### **5.2.1 Spezifische Aktivierung des Tyrosinasepromotors von Medaka in Melanomzellen**

Die Sequenz des Tyrosinasegens, sowie das entsprechende DNA-Fragment waren von Professor Hori (Nagoya, Japan) zur Verfügung gestellt worden und es war bekannt, dass sich in einem 3,2 kb großen Fragment, 5´ zum Transkriptionsstart, eine charakteristische CATGTG Sequenz auf Position -126 bis -131 befindet (Inagaki et al., 1998). Ebenfalls aus der Literatur war bekannt, dass diese 3 kb der 5´ flankierenden Region ausreichend für eine gewebespezifische Expression sind (Inagaki et al., 1998). Dieser Sequenzbereich scheint alle wichtigen regulatorischen Elemente für eine zelltypspezifische Transkriptionsaktivierung zu beinhalten.

Dieses 3,2 kb große Fragment besitzt allerdings nicht nur das eine CATGTG Motiv bei -126/-131 (benannt als *Mitf*-Bindungsstelle A) wie Inagaki et al. (1998) postulierte, sondern zwei weitere E-Box Motive, die ebenfalls als

mutmaßliche Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor Mitf gelten; die weiter 5' liegenden Bindungsstelle B (-2651/-2656) und Bindungsstelle C (-2866/-2871).

Die Ergebnisse der transienten Transfektionen verschiedener Konstrukte zeigten, dass die 3 kb 5' flankierende Sequenz des Medaka Tyrosinasegens ausreicht, auch in *Xiphophorus* Zellen eine starke, melanozyten- bzw. melanomspezifische Expression zu bekommen. Wie die Ergebnisse zeigten ist der Tyrosinasegenpromotor spezifisch aktiv in den Melanomzellen PSM. In der embryonalen Zelllinie A2 führten die Transfektionen zu keiner vergleichbaren Luciferaseaktivität (4.2.1). Für die Aktivität dieses Promotors sind die Regionen wichtig, die E-Boxen, Bindungsstellen für Proteine der b-HLH-ZIP Transkriptionsfaktor-Superfamilie, enthalten.

Die Aktivitäten der unterschiedlichen Promotorfragmente korrelierten mit der Präsenz bzw. der Anzahl der mutmaßlichen Bindungsstellen für Mitf. Die E-Box, die dem Transkriptionsstart am nächsten liegt, Mitf-Bindungsstelle A, reichte aus, um dem Basalpromotor Melanozyten- bzw. Melanomspezifität zu verleihen. Die Experimente zeigten dass die mutmaßliche Mitf-Bindungsstelle A nicht nur wichtig für eine melanomspezifische Transkriptionsaktivierung ist, sondern essentiell für die Spezifität. Eine Mutation in der E-Box-Sequenz verringerte die Promotoraktivität auf den Level des Minimalpromotors (Abb. 4.2.4), und zeigte keinen Unterschied zwischen der embryonalen (A2) und der Melanom-Zelllinie (PSM) von *Xiphophorus*.

Die Tyrosinasegene der Säugetiere weisen ähnliche Charakteristika auf. Mutationen in der CATGTG Kernsequenz im natürlich vorkommenden Sequenzkontext verringern, wie auch in dieser Arbeit für das Fischsystem gezeigt wurde, die Promotoraktivität deutlich (Ganss et al., 1994; Bentley et al., 1994). Die Promotorsequenzen zwischen Fischen und Säugern unterscheiden sich allerdings voneinander. Im Maus- und im humanen Promotor, welchen wie dem Medakagen eine TATA-Box fehlt, ist in der Initiatorregion eine E-Box vorhanden. Diese jedoch hat keine Sequenzähnlichkeit zu der Medaka-Sequenz, die an dieser Stelle keine E-Box enthält (Inagaki et al., 1998). In beiden Säugergenen findet sich eine M-Box, die neben dem zentralen Kernmotiv CATGTG weitere homologe

Sequenzregionen zu den Promotoren der *trp-1* Gene besitzt. Diese M-Box liegt 100 bp 5' zu der Transkriptionsstartstelle, befindet sich also an ähnlicher Stelle wie die E-Box A im Tyrosinasepromotor von Medaka. Auch für Säuger wurde nachgewiesen, dass Promotorkonstrukte mit Deletionen am 5' Ende des Promotors, die diese M-Box unbeschadet lassen, melanozyten-spezifische Expression vermitteln können. Die Promotoren von Wachtel und Schildkröte besitzen ebenfalls eine E- und eine M-Box in dieser Region (Yamamoto et al., 1992; Ferguson und Kidson, 1997). Das Tyrosinasegen des Frosches hingegen hat nur eine E-Box (Miura et al., 1995; Ferguson und Kidson, 1997). Leider fehlen in der Literatur von diesen Spezies bisher funktionelle Daten hierzu. Die bekannten Daten aber aus der Literatur von Maus und Mensch, und die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse führen zur Interpretation, dass diese nahe der Transkriptionsstartstelle sitzende potentielle Mitf-Bindungsstelle wichtig für die gewebespezifische Transaktivierung des Tyrosinasegens ist. Die starke Konservierung dieses Promotorelements in der Evolution unterstützen diese Aussage.

Deletionen großer Promotorbereiche im Medaka Tyrosinasegen mit den zwei weiter 5' liegenden CATGTG Motiven, den potentiellen Mitf-Bindungsstellen B und C, verringerten die Promotoraktivität. In Experimenten, in denen die einzelnen Bindungsstellen B und C direkt 5' vor einen Minimalpromotor kloniert wurden (siehe 4.2.2.2), konnte gezeigt werden, dass sie die Aktivität der Luciferase erhöhen konnten. Diese beiden distal liegenden mutmaßlichen Mitf-Bindungsstellen scheinen eine Rolle in der transkriptionellen Aktivierung zu spielen. Die Experimente zeigten auch, dass aber nur die Kombination von beiden Elementen eine Mutation im proximalen Element, der mutierten Bindungsstelle Amut, auszugleichen vermag. Allerdings gaben die Daten Hinweise drauf dass zwei intakte Mitf-Bindungsstellen im Promotor für eine starke transkriptionelle Aktivierung in der Melanomzelllinie PSM auszureichen scheinen und dieser Effekt außerdem unabhängig von der Position dieser zwei Bindungsstellen im Promotor ist. Auch im humanen Gen befinden sich zwei E-Boxen weiter 5' gelegen. Hier scheint aber die am weitesten von der Transkriptionsstartstelle entfernt liegende E-Box nicht notwendig für eine pigmentzellspezifische Expression zu sein. Die andere E-Box liegt in einer Region, die als TDE (tyrosinase distal element) bezeichnet

wird und hat, wie die E-Box A im Fisch Tyrosinasegenpromotor, eine melanozytenspezifische, verstärkende Funktion (Yasumoto et al., 1994).

Trotz der nur sehr geringen Konservierung auf Sequenzebene, scheint die Anordnung der wichtigen regulatorischen Elemente in den Promotoren aller erwähnten Spezies gleich oder zumindest sehr ähnlich zu sein. Dies weist auf eine Konservierung während der Evolution auf struktureller Ebene hin.

Eine nahe des Promotors sitzende Bindungsstelle für ein b-HLH-Zip Protein, ermöglicht dem homologen Minimalpromotor, der Transkription auf Basalniveau anschaltet, die Zelltypspezifität. Für eine starke Transkription werden jedoch weitere, dieser Bindungsstelle ähnlich strukturierte 5´ liegende Sequenzmotive benötigt. Die Transfektionsergebnisse zeigten deutlich, dass die E-Boxen im Tyrosinasegenpromotor zwar wesentlich für eine starke Promotoraktivität sind, aber dass sie nicht alleine verantwortlich für eine zelltypspezifische transkriptionelle Aktivierung sind. Ein Plasmid, bei dem die drei E-Boxen des Tyrosinasepromotors von Medaka vor einen heterologen Minimalpromotor (aus dem Thymidinkinasegen des Herpes Simplex Viruses) fusioniert wurden, bewirkte sowohl in Melanomzellen wie in nicht-Melanomzellen eine starke Expression. Dieser Effekt ist nicht auf den heterologen Basalpromotor zurückzuführen, denn das große 5´ liegende Fragment von -3173 bis -32 aus dem Tyrosinasepromotor von Medaka konnte dem heterologen tk-Promotor Zelltypspezifität und Aktivität vermitteln. Die transkriptionelle Aktivierung war allerdings tatsächlich stärker mit dem homologen Promotor (siehe Abb. 4.2.5). Auch im Maussystem wurde durch Experimente, in denen ein Tetramer der M-Box vor den tk-Promotor fusioniert worden war, ein Verlust der Gewebe- und Zellspezifität beobachtet (Ganss et al., 1994). Zusammengefasst deuten all diese Ergebnisse daraufhin, dass die E-Boxen des Tyrosinasepromotors von Medaka gebraucht werden, um eine starke transkriptionelle Aktivierung in Melanomzellen zu erreichen. Es zeigte sich jedoch, dass die E-Boxen alleine nicht ausreichend sind, um Zelltypspezifität zu vermitteln. Es müssen zusätzliche regulatorische Elemente, die die Promotoraktivität auf Melanomzellen beschränken, vorhanden sein. Da diese E-Box Motive offensichtlich

wesentlich für die Transkriptionsaktivierung sind, war es interessant zu erfahren welche Proteine der b-HLH-Leuzinzipper-Familie binden.

### **5.2.2 Die Rolle von Mitf in der melanomspezifischen Transkriptionsaktivierung**

Es konnte gezeigt werden, dass mit großer Wahrscheinlichkeit alle drei E-Boxen des Medaka Promotors ein gemeinsames Protein aus der *Xiphophorus* Melanomzelllinie PSM binden. Es könnte zwar auch sein, dass ähnliche Proteine mit gleichem Molekulargewicht, gebunden haben, und zu ähnlich retardierten Komplexen führten, wahrscheinlicher aber ist die Schlußfolgerung dass es sich um ein gemeinsames Protein handelte. Dabei war die Bindung von einem korrekten CATGTG Motiv abhängig, wie der Vergleich mit den mutierten Oligonukleotiden zeigte (siehe Abb. 4.2.3). Keine der E-Boxen des Medaka Tyrosinasepromotors ist Teil einer echten M-Box. Alle drei Bindungsstellen haben ein an die CATGTG Kernsequenz anschließendes Adenin. Diese Sequenzanordnung findet man weder in den M-Boxen, noch in den TDEs der Tyrosinasegene von Mensch, Maus, Wachtel oder Schildkröte (Aksan und Goding, 1998). Man findet sie jedoch bei allen vier Genen im Bereich des Initiators, der für die Promotoraktivität verantwortlich ist. Diese E-Box in dieser Region wird wie eine M-Box vom Microphthalmia Protein Mitf als Zielsequenz erkannt (Bentley et al., 1994; Yasumoto et al., 1997; Ferguson und Kidson, 1997). Die Mutation der E-Box in den durchgeführten Untersuchungen zur Proteinbindekazapazität der einzelnen E-Box-Sequenzen, verhinderte die Komplexbildung in vitro, was darauf schliessen ließ, dass dieser im EMSA gezeigte DNA/Proteinkomplex nur geformt werden konnte mit einem Protein, das eine intakte E-Box zur Bindung benötigt. Da das für b-HLH-Zip Proteine, wie Mitf, zutrifft und außerdem bekannt war, dass Mitf die Tyrosinasegene bei Säugern reguliert, lag die Vermutung nahe, dass Mitf auch mit den E-Boxen im Medaka Tyrosinasegen interagieren kann und es somit Mitf ist, welches in den EMSAs anhand der Komplexbildung nachgewiesen werden konnte. Da keine Supershift-Experimente, d.h. kompetitive Versuche mit anderen Proteinen, durchgeführt wurden, konnte kein direkter Nachweis für eine DNA/Mitf-Komplexbildung erbracht werden. Allerdings kann aus den EMSA Studien

zusammen mit den Transfektionsergebnissen geschlossen werden, dass es sich bei dem Protein um Mitf handelt, und es konnte zumindest ein indirekter Nachweis erbracht werden.

Auch die Ergebnisse der Co-Transfektionen sind ein weiteres Indiz dafür dass Mitf mit den E-Boxen des Tyrosinasegenpromotors interagiert. In Co-Transfektionsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die melanozyten- und melanomspezifische Mitf-Isoform M, ektopisch durch ein Expressionsplasmid in die Zellen eingebracht, auch in der nicht-Melanomzelllinie A2 den Tyrosinasepromotor von Medaka stark aktivieren kann, und dabei die E-Boxen wichtig für die Transaktivierung sind (4.2.3). Aus den Daten kann die Schlußfolgerung gezogen werden, dass auch in diesen Zellen alle sonstigen Proteine und Cofaktoren, die für eine Aktivierung des Tyrosinasepromotors benötigt werden, vorhanden sind. Eine Transaktivierung des Tyrosinasepromotors von Medaka durch *Xiphophorus* Mitf-M konnte auch in einer humanen Zelllinie (293T) gezeigt werden. Hier waren die Effekte zwar etwas schwächer, dies ist aber wohl zurückzuführen auf Spezies-spezifische Variationen in der Primärsequenz des Proteins. Diese Unterschiede scheinen dann wiederum zu schwächeren Interaktionen mit den Cofaktoren oder anderen Sequenzelementen im Promotor zu führen, die dann deshalb nur teilweise ihre Funktion in den Säugerzellen erfüllen können.

Wie gezeigt werden konnte, ist ektopisch eingebrachtes Mitf-M in der Lage in embryonalen Fischzellen (A2) oder auch in Säugerzellen Tyrosinasepromotorkonstrukte zu aktivieren. Melanom- und nicht-Melanomzellen scheinen sich nur durch die Anwesenheit von Mitf zu unterscheiden.

### 5.3 Mitf als wichtiges regulatorisches Element in der Signalkaskade

Die Experimente zur Untersuchung der Rolle von Mitf in der Signaltransduktion zeigten eine Aktivierung des Tyrosinasegenpromotors von Medaka in den *Xiphophorus* Melanomzellen PSM nach Inhibition der Mitogen-aktivierte Protein(MAP)kinasekinase (MEK) und damit der MAPK. Dieser Effekt der Promotoraktivierung wurde über die E-Box und somit höchstwahrscheinlich über Mitf vermittelt. Diese Resultate waren eher unerwartet, da Mitf durch aktivierte MAPK aktiviert wird (Hemesath et al., 1998) und die Inhibition der MAPK deshalb zu einer geringeren Aktivierung von Mitf-abhängigen Promotoren, wie dem Tyrosinasegenpromotor, führen sollte.

Unsere Ergebnisse wurden unterstützt durch Befunde aus Experimenten, die von Dr. Claudia Wellbrock und Christin Froschauer hier im Labor durchgeführt worden waren. Sie fanden, dass die Inhibition von Xmrk, einer hochaktiven Rezeptortyrosinkinase in PSM Zellen, die die MAPkinase aktiviert (Wellbrock und Scharf, 1999), zu einer Verringerung der Konzentration an aktiver MAPK führte. Ihre Experimente zeigten außerdem, dass die Inhibition von Xmrk durch das Tyrphostin AG555, einem spezifischen Inhibitor der Xmrk Tyrosinkinase-Aktivität (Wellbrock et al., 1998), genau wie die direkte Inhibition der MAPK durch den MEK-Inhibitor in einer verstärkten Tyrosinasegenpromotoraktivität resultierte (C. Wellbrock/C. Froschauer, persönliche Mitteilung).

Aus der Literatur ist allerdings auch bekannt, dass die Phosphorylierung von MITF durch MAPK an Serin 73 zu einer verstärkten Degradation führt (Wu et al., 2000). In der gleichen Veröffentlichung wurde gezeigt, dass co-transfiziertes wildtypisches Mitf auch ohne Stimulus ein Tyrosinasepromotorkonstrukt in den Säugerzellen NIH3T3 und in Melanomzellen (501 MEL) aktivieren kann. Das läßt die Folgerung zu, dass auch nicht-phosphoryliertes MITF die Kapazität zur Transaktivierung besitzt.

In den *Xiphophorus* Melanomzellen PSM ist ein permanenter Level an Mitf-M vorhanden (Altschmied et al., 2002). Außerdem wird in diesen Zellen eine konstitutiv hochaktive Rezeptortyrosinkinase (Xmrk), das Genprodukt des

Tumor-induzierenden Onkogens *Xmrk*, exprimiert. Dieser Rezeptor wirkt als starker Aktivator des MAPkinase-Signalwegs und der MAPkinase Aktivität selbst (Wellbrock und Scharl, 1999). Dieses hochaktive *Xmrk* führt wahrscheinlich zu einer Destabilisierung von Mitf. Die Inhibition der MAPK im MAPK-Signaltransduktionsweg bzw. die Inhibition von *Xmrk* direkt resultiert in einer Stabilisierung von Mitf und damit in einer größeren Menge an transkriptionsaktivierendem Mitf, da nachweislich auch die nicht-phosphorylierte Form aktivieren kann (Wu et al., 2000), und in einer deswegen erhöhten Aktivität des Tyrosinasegenpromotors und der Luciferaseaktivität.

## 6 Zusammenfassung

Die Kenntnis der Transkriptionsregulationsmechanismen stellt eine wichtige biochemische Grundlage für das Verständnis der molekularen Ereignisse, die der Krebsentstehung zugrunde liegen, dar. Eine Schlüsselrolle in der transkriptionellen Kontrolle der Genexpression spielen hierbei die Transkriptionsfaktoren. Diese sind nukleäre Proteine, die mit spezifischen DNA-Elementen interagieren und so die Transkription eines in *cis*-Position lokalisierten Zielgens regulieren. Da der "microphthalmia associated" Transkriptionsfaktor Mitf-M spezifisch in Melanozyten und Melanomzellen exprimiert wird, scheint er eine wichtige Rolle in der melanomspezifischen transkriptionellen Aktivierung zu spielen und war deshalb im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht worden.

Das *Xiphophorus* Melanomsystem, ein genetisch gut charakterisiertes Modell, wurde herangezogen, um unter Zuhilfenahme des Tyrosinasegens des mit *Xiphophorus* nahe verwandten Medaka (*Oryzias latipes*) die Transkriptionsregulation im Melanom näher zu untersuchen. Zuerst wurde gezeigt, dass der Medaka Tyrosinasepromotor spezifisch in einer Melanomzelllinie von *Xiphophorus* (PSM Zellen) aktiviert wird. Eine 3,2 kb lange Sequenz, die 5' zum Transkriptionsstart liegt, reicht dabei aus, eine extrem hohe, melanomspezifische Promotoraktivität zu erreichen. Dabei sind die Regionen, die sogenannte E-Boxen (CANNTG) enthalten, von besonderer Wichtigkeit für die Promotoraktivität in der Melanomzelllinie, während sie in embryonalen *Xiphophorus*zellen (A2, als Kontrollzellen eingesetzt) keinen Einfluß auf die Expression haben. An diese E-Box-Sequenzen binden sogenannte b-HLH-Leuzinzipper Transkriptionsfaktoren. Es konnte auf indirektem Wege bewiesen werden, dass es das Protein Mitf sein muß, das an die E-Boxen im Tyrosinasegenpromotor bindet und somit die transkriptionelle Aktivierung ausübt. In EMSA Studien wurde gezeigt, dass die E-Boxen ein Kernprotein aus PSM-Zellen binden, und dass dieses spezifisch an diese 6 bp lange Sequenz bindet, da Mutationen der zentralen Oligonukleotid-Sequenz die Bindung zerstörten. Ein weiterer indirekter Beweis für die Bindung von Mitf an diese E-Boxen konnte durch Co-Transfektionsexperimente erbracht werden. Auch in Säugerfibroblastenzellen

konnte ektopisch eingebrachtes Mitf-M die Medaka Tyrosinasegenpromotorkonstrukte durch Bindung an E-Boxen aktivieren und das Luciferasegen zur Expression bringen. Das heißt also, dass Mitf-M ausreicht um sogar in nicht-Melanomzellen den Tyrosinasegenpromotor zu transaktivieren. Aufgrund dieser verschiedenen Experimente konnte gefolgert werden, dass diese Mitf-Bindungsstellen essentiell für eine hohe melanom- oder pigmentzellspezifische Promotoraktivität sind. Die Bindungsstelle A, die nahe der Basalpromotorregion im Medaka Tyrosinasegen liegt (-126/-131), scheint hierbei besonders wichtig für die Promotoraktivität und vor allem auch für die Vermittlung der Zelltypspezifität zu sein. Promotorkonstrukte mit den drei E-Boxen A (-126/-131), B (-2651/-2656) und C (-2866/-2871) zeigten eine gegenüber dem Konstrukt nur mit der A-Bindungsstelle höhere Aktivität. Es scheint sich ein additiver Effekt der Mitf-Bindungsstellen auszuwirken. Es konnte allerdings auch gezeigt werden, dass die E-Boxen nicht alleine verantwortlich für die Melanom- bzw. Pigmentzellspezifität sind. Neben den Mitf-Bindungsstellen gibt es noch weitere Elemente im Tyrosinasegenpromotor, die an der Bestimmung der Spezifität beteiligt sind, und die zwar durch Deletionsreihen im Promotor eingegrenzt, dennoch noch nicht eindeutig bestimmt werden konnten.

Die Wichtigkeit des Transkriptionsfaktors Mitf bzw. seiner Funktionen spiegelt sich auch in seiner starken Konservierung im Laufe der Evolution wider. Vergleichende Studien zeigten dass der Transkriptionsfaktor mit seinen verschiedenen Isoformen in Säugern wie in Vertebraten gut konserviert wurde. Nähere Analysen konnten das Vorhandensein zweier separater Gene für Mitf-M und Mitf-B bei Teleostiern nachweisen, während bei Säugetieren und Vögeln nur ein einziges Gen für die unterschiedlichen Mitf Proteine kodiert.

Für das Verständnis der molekularen Prozesse bei der Melanombildung von *Xiphophorus* war es wichtig die Rolle von Mitf in der Signaltransduktion zu analysieren. Es war möglich einen direkten Zusammenhang zwischen der in PSM Zellen exprimierten Rezeptortyrosinkinase Xmrk, dem Genprodukt des Tumor-induzierenden Onkogens von *Xiphophorus*, und dem Transkriptionsfaktor Mitf nachzuweisen und seine Regulation über Signal-

transduktionswege näher zu klären. Die Regulation von Mitf über den MAPkinase-Weg, konnte durch Inhibitorexperimente nachgewiesen werden. Aufgrund der zahlreichen Aktivitäten von Mitf innerhalb der Melanozyten, und seiner Aktivierungsfunktion für verschiedene Zielgene, ist dieser Transkriptionsfaktor von großer Bedeutung für sowohl Differenzierung/Pigmentierung wie auch Proliferation/Überleben der Tumorzellen.

## 7 Summary

The analysis of transcriptional regulation is the essential biochemical basis for understanding the molecular mechanisms underlying cancer development. A key role in the transcriptional control of gene expression is played by transcription factors. These are nuclear proteins, interacting with specific DNA elements and thereby regulating the transcription of a target gene, which is located in *cis* position. The microphthalmia associated transcription factor Mitf-M, which is expressed specifically in melanocytes and melanoma cells seems to play an important role in the melanoma specific transcriptional activation. This thesis therefore focused on the function and the role of Mitf.

The genetically well characterized *Xiphophorus* melanoma system was used as a model. Utilizing the tyrosinase gene of the closely related Medaka (*Oryzias latipes*) the transcriptional regulation in melanoma was investigated. First it was shown that the Medaka tyrosinase promoter was activated specifically in a melanoma cell line from *Xiphophorus* (PSM cells). A 3,2 kb sequence upstream the transcription start is sufficient for a high melanoma specific promoter activation. The region containing so called E-boxes (CANNTG) is of special importance for the promoter activity in the melanoma cell line whereas in embryonic cells from *Xiphophorus* (A2 cells, as control) the E-boxes had no influence on the expression.

Members of the b-HLH-leucin zipper transcription factor family bind to this E-boxes. An indirect approach showed that it has to be the protein Mitf that binds to the E-boxes in the promoter of the tyrosinase gene and thereby mediates transcriptional activation. EMSA studies revealed a nuclear protein from PSM cells binding to the E-boxes. This binding occurs specifically to the 6 bp core sequence since mutations of the central oligonucleotid sequence destroyed the binding. An further indirect proof for the binding of Mitf to the E-boxes and thus regulation by Mitf, was obtained through co-transfection experiments. Ectopically delivered Mitf-M even in mammalian fibroblasts activated tyrosinase gene promoter constructs via binding to the E-boxes and by that mediated expression of the luciferase gene. Mitf-M is sufficient to transactivate the tyrosinase gene promoter even in non-melanoma cells. On

the basis of these experiments it was concluded that the Mitf binding sites are essential for a high melanoma or pigment cell specific promoter activity. The binding site A, located near the basal promoter region in the Medaka tyrosinase gene (-126/-131), appears to be of a special importance for the promoter activity and for the mediation of tissue specificity. In comparison with the construct only with binding site A, the promoter constructs with all three E-boxes A (-126/-131), B (-2651/-2656) and C (-2866/-2871) showed a higher activity. This seems to be an additive effect of the Mitf binding sites. But it could be shown as well that it are not the E-boxes alone that are responsible for melanoma specificity. Besides the Mitf binding sites there exist further elements in the tyrosinase gene promoter that contribute to the specificity. Experiments with deletion constructs could help to narrow down these elements in the promoter, but they are not yet precisely determined.

The importance of the transcription factor Mitf and its functions is reflected as well in its strong evolutionary conservation. Comparative studies showed that the transcription factor with its different isoforms is well conserved between mammals and lower vertebrates. More detailed analysis proved the presence of two separate genes for Mitf-M and Mitf-B in teleosts, whereas in mammals and birds only one single gene exists, coding for the different Mitf proteins.

For understanding the molecular mechanisms of melanoma formation in *Xiphophorus* it was important to analyse the role of Mitf in signal transduction in the tumor cells. It was possible to demonstrate a direct link between the receptor tyrosine kinase Xmrk, the gene product of the tumor inducing oncogene in *Xiphophorus*, which is expressed in PSM cells and Mitf, and to contribute to its regulation in signal transduction pathways. A regulation of Mitf by the MAPkinase pathway was shown by inhibitor experiments. Because of the numerous activities of Mitf in melanocytes this transcription factor plays a pivotal role in the activation of various genes of high importance for differentiation/pigmentation as well as proliferation/survival of the cells.

**8 Abkürzungen**

[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP	$\alpha$ -markiertes 2'-Desoxycytidin-5'-Triphosphat
aa	amino acids / Aminosäuren
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie
CIP	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
cpm	counts per minute / Zählimpulse pro Minute
dATP/CTP/GTP/TTP	2'-Desoxy-Adenosin/Cytidin/Guanosin/Thymidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fötale Kälberserum
[ $\gamma^{32}\text{P}$ ]ATP	$\gamma$ -markiertes Adenosin-5'-Triphosphat
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HSV	Herpes Simplex Virus
H <sub>2</sub> O	Wasser
J	Joule
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
l	Liter

---

LB	Luria-Bertani-Medium
μ	Micro- ( $\times 10^{-6}$ )
m	Milli- ( $\times 10^{-3}$ )
M	molar, mol/l
min	Minute(n)
<i>mitf</i>	“Microphthalmia associated transcription factor”/Gen
hMITF	“Microphthalmia associated transcription factor” Protein (Mensch)
Mitf	“Microphthalmia associated transcription factor” Protein
mRNA	“messenger”-RNA
mut	Mutante
n	Nano ( $\times 10^{-9}$ )
NaAc	Natriumacetat
nt	Nukleotide
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
p	Piko-, ( $\times 10^{-12}$ )
p.a.	„pro analysi“
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Ketten- reaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonsäurefluorid
PNK	Polynukleotidkinase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat Puffer
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer

TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
tk	Thymidinkinase
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units, Enzymeinheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
(v/v)	Volumen pro Volumen
Vol	Volumen
W	Watt
(w/v)	Masse pro Volumen
wt	Wildtyp
<i>X.h.</i> oder <i>X.hell.</i>	<i>Xiphophorus helleri</i>
<i>X.mac</i>	<i>Xiphophorus maculatus</i>
Xmrk	<i>Xiphophorus</i> -Melanom-Rezeptor-Kinase

## 9 Literatur

- Ahuja, M.R. und F.Anders. 1976. A genetic concept of the origin of cancer, based in part upon studies of neoplasms in fishes. *Prog. Exp. Tumor Res.* 20:380-397.
- Aksan, I. und C.R.Goding. 1998. Targeting the microphthalmia basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription factor to a subset of E-box elements in vitro and in vivo. *Mol. Cell Biol.* 18:6930-6938.
- Altschmied, J., J.Delfgaauw, B.Wilde, J.Duschl, L.Bouneau, J.N.Volff, und M.Schartl. 2002. Subfunctionalization of Duplicate mitf Genes Associated With Differential Degeneration of Alternative Exons in Fish. *Genetics* 161:259-267.
- Altschmied, J. und J.Duschl. 1997. Set of optimized luciferase reporter gene plasmids compatible with widely used CAT vectors. *Biotechniques* 23:436-438.
- Amae, S., N.Fuse, K.Yasumoto, S.Sato, I.Yajima, H.Yamamoto, T.Udono, Y.K.Durlu, M.Tamai, K.Takahashi, und S.Shibahara. 1998b. Identification of a novel isoform of microphthalmia-associated transcription factor that is enriched in retinal pigment epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247:710-715.
- Amae, S., N.Fuse, K.Yasumoto, S.Sato, I.Yajima, H.Yamamoto, T.Udono, Y.K.Durlu, M.Tamai, K.Takahashi, und S.Shibahara. 1998a. Identification of a novel isoform of microphthalmia-associated transcription factor that is enriched in retinal pigment epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247:710-715.
- Amiel, J., P.M.Watkin, M.Tassabehji, A.P.Read, und R.M.Winter. 1998. Mutation of the MITF gene in albinism-deafness syndrome (Tietz syndrome). *Clin. Dysmorphol.* 7:17-20.
- Amores, A., A.Force, Y.L.Yan, L.Joly, C.Amemiya, A.Fritz, R.K.Ho, J.Langeland, V.Prince, Y.L.Wang, M.Westerfield, M.Ekker, und J.H.Postlethwait. 1998. Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 282:1711-1714.

- Anders, F., M.Schartl, und A.Barnekow. 1984. Xiphophorus as an in vivo model for studies on oncogenes. *Natl. Cancer Inst. Monogr* 65:97-109.
- Andrews, N.C. und D.V.Faller. 1991. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 19: 2499
- Atchley, W.R. und W.M.Fitch. 1997. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94:5172-5176.
- Avruch, J., X.F.Zhang, und J.M.Kyriakis. 1994. Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem. Sci.* 19:279-283.
- Baudler, M., J.Duschl, C.Winkler, M.Schartl, und J.Altschmied. 1997. Activation of transcription of the melanoma inducing Xmrk oncogene by a GC box element. *J. Biol. Chem.* 272:131-137.
- Beckmann, H., L.K.Su, und T.Kadesch. 1990. TFE3: a helix-loop-helix protein that activates transcription through the immunoglobulin enhancer muE3 motif. *Genes Dev.* 4:167-179.
- Bentley, N.J., T.Eisen, und C.R.Goding. 1994. Melanocyte-specific expression of the human tyrosinase promoter: activation by the microphthalmia gene product and role of the initiator. *Mol. Cell Biol.* 14:7996-8006.
- Bertolotto, C., P.Abbe, T.J.Hemesath, K.Bille, D.E.Fisher, J.P.Ortonne, und R.Ballotti. 1998. Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J. Cell Biol.* 142:827-835.
- Boveri, T. 1914. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Gustav Fischer Verlag, Jena
- Bradford, M.B. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254

- Bucher, P. 1990. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J. Mol. Biol.* 212:563-578.
- Calkhoven, C.F. und G.Ab. 1996. Multiple steps in the regulation of transcription-factor level and activity. *Biochem. J.* 317 ( Pt 2):329-342.
- Carr, C.S. und P.A.Sharp. 1990. A helix-loop-helix protein related to the immunoglobulin E box-binding proteins. *Mol. Cell Biol.* 10:4384-4388.
- Chiang, E.F., C.I.Pai, M.Wyatt, Y.L.Yan, J.Postlethwait, und B.Chung. 2001. Two sox9 genes on duplicated zebrafish chromosomes: expression of similar transcription activators in distinct sites. *Dev. Biol.* 231:149-163.
- Davis, R.J. 1994. MAPKs: new JNK expands the group. *Trends Biochem. Sci.* 19:470-473.
- Drapkin, R., A.Merino, und D.Reinberg. 1993. Regulation of RNA polymerase II transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:469-476.
- Ferguson, C.A. und S.H.Kidson. 1997. The regulation of tyrosinase gene transcription. *Pigment Cell Res.* 10:127-138.
- Fried, M. und D.M.Crothers. 1981. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucl. Acids Res.* 9: 3047-3060
- Friend, S.H. 1993. Genetic models for studying cancer susceptibility. *Science* 259:774-775.
- Fuse, N., K.Yasumoto, H.Suzuki, K.Takahashi, und S.Shibahara. 1996. Identification of a melanocyte-type promoter of the microphthalmia-associated transcription factor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219:702-707.
- Fuse, N., K.Yasumoto, K.Takeda, S.Amae, M.Yoshizawa, T.Udono, K.Takahashi, M.Tamai, Y.Tomita, M.Tachibana, und S.Shibahara. 1999. Molecular cloning of cDNA encoding a novel microphthalmia-associated transcription factor isoform with a distinct amino-terminus. *J. Biochem. (Tokyo)* 126:1043-1051.

- Ganss, R., G.Schutz, und F.Beermann. 1994. The mouse tyrosinase gene. Promoter modulation by positive and negative regulatory elements. *J. Biol. Chem.* 269:29808-29816.
- Goding, C.R. 2000. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev.* 14:1712-1728.
- Gordon, M. 1927. The genetics of a viviparous top-minnow *Platyopocilus*; the inheritance of two kinds of melanophores. *Genetics* 12: 253-283
- Häussler, G. 1928. Über Melanombildungen bei Bastarden von *Xiphophorus helleri* und *Platyopocilus maculatus var. rubra*. *Klin. Wochenschr.* 33: 1561-1562
- Hanahan, D. 1985. Techniques for transformation of *E. coli*. In Glover, D. M. (ed.): DNA-cloning (Vol. I) - a practical approach, IL Press, Oxford, 109-135
- Hearing, V.J. 1987. Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): purification, properties, and reactions catalyzed. *Methods Enzymol.* 142:154-165.
- Heldin, C.H. 1995. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell* 80:213-223.
- Hemesath, T.J., E.R.Price, C.Takemoto, T.Badalian, und D.E.Fisher. 1998. MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* 391:298-301.
- Hernandez, N. 1993. TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev.* 7:1291-1308.
- Hill, C.S. und R.Treisman. 1995. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 80:199-211.
- Hodgkinson, C.A., K.J.Moore, A.Nakayama, E.Steingrimsson, N.G.Copeland, N.A.Jenkins, und H.Arnheiter. 1993. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 74:395-404.

- Hughes, A.E., V.E.Newton, X.Z.Liu, und A.P.Read. 1994. A gene for Waardenburg syndrome type 2 maps close to the human homologue of the microphthalmia gene at chromosome 3p12-p14.1. *Nat. Genet.* 7:509-512.
- Inagaki, H., A.Koga, Y.Bessho, und H.Hori. 1998. The tyrosinase gene from medakafish: transgenic expression rescues albino mutation. *Pigment Cell Res.* 11:283-290.
- Jackson, I.J., D.M.Chambers, K.Tsukamoto, N.G.Copeland, D.J.Gilbert, N.A.Jenkins, und V.Hearing. 1992. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *EMBO J.* 11:527-535.
- Kallmann, K.D. 1975. The platyfish, *Xiphophorus maculatus*. In: „Handbook of genetics“, Vol.4: 81-132, King Robert C. (ed.), Plenum Press, New York und London
- Kobayashi, T., K.Urabe, A.Winder, C.Jimenez-Cervantes, G.Imokawa, T.Brewington, F.Solano, J.C.Garcia-Borrón, und V.J.Hearing. 1994. Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J.* 13:5818-5825.
- Kosswig, C. 1928. Über Kreuzungen zwischen den Teleostiern *Xiphophorus helleri* und *Platypoecilus maculatus*. *Indukt. Abstammung.-Vererbungsbl.* 47: 150-158
- Kosswig, C. 1929. Das Gen in fremder Erbmasse. *Züchter* 1: 152-157
- Kuhn, C., U.Vielkind und F.Anders. 1979. Cell cultures derived from embryos and melanoma of poeciliid fish. *In Vitro* 15: 537-544
- Kyriakis, J.M., P.Banerjee, E.Nikolakaki, T.Dai, E.A.Rubie, M.F.Ahmad, J.Avruch, und J.R.Woodgett. 1994. The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369:156-160.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

- Lane, D., P.Prentki und M.Chandler. 1992. Use of gel retardation to analyse protein-nucleic acid interactions. *Microbiol. Rev.* 56: 509-528
- Leevers, S.J., H.F.Paterson, und C.J.Marshall. 1994. Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature* 369:411-414.
- Lister, J.A., J.Close, und D.W.Raible. 2001. Duplicate mitf genes in zebrafish: complementary expression and conservation of melanogenic potential. *Dev. Biol.* 237:333-344.
- Mäueler, W., A.Barnekow, E.Eigenbrodt, F.Raulf, H.F.Falk, A.Telling und M.Schartl. 1988. Different regulation of oncogene expression in tumor and embryonal cells of *Xiphophorus*. *Oncogene* 3: 113-122
- Malitschek, B., J.Wittbrodt, P.Fischer, R.Lammers, A.Ullrich, und M.Schartl. 1994. Autocrine stimulation of the Xmrk receptor tyrosine kinase in *Xiphophorus* melanoma cells and identification of a source for the physiological ligand. *J. Biol. Chem.* 269:10423-10430.
- Mangelsdorf, D.J., C.Thummel, M.Beato, P.Herrlich, G.Schutz, K.Umesono, B.Blumberg, P.Kastner, M.Mark und P.Chambon. 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83:835-839.
- Maniatis, T., E.F.Fritsch und J.Sambrook. 1982. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory, New York
- Marais, R., J.Wynne und R.Treisman. 1993. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell* 73:381-393.
- Marshall, C.J. 1994. Signal transduction. Hot lips and phosphorylation of protein kinases. *Nature* 367:686.
- Meyer, A., J.M.Morrissey und M.Schartl. 1994. Recurrent origin of a sexually selected trait in *Xiphophorus* fishes inferred from a molecular phylogeny. *Nature* 368:539-542.
- Meyer, A. und M.Schartl. 1999. Gene and genome duplications in vertebrates: the one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:699-704.

- Miura, I., H.Okumoto, K.Makino, A.Nakata und M.Nishioka. 1995. Analysis of the tyrosinase gene of the Japanese pond frog, *Rana nigromaculata*: cloning and nucleotide sequence of the genomic DNA containing the tyrosinase gene and its flanking regions. *Jpn. J. Genet.* 70:79-92.
- Mochii, M., Y.Mazaki, N.Mizuno, H.Hayashi und G.Eguchi. 1998. Role of Mitf in differentiation and transdifferentiation of chicken pigmented epithelial cell. *Dev. Biol.* 193:47-62.
- Nobukuni, Y., A.Watanabe, K.Takeda, H.Skarka und M.Tachibana. 1996. Analyses of loss-of-function mutations of the MITF gene suggest that haploinsufficiency is a cause of Waardenburg syndrome type 2A. *Am. J. Hum. Genet.* 59:76-83.
- Novina, C.D. und A.L.Roy. 1996. Core promoters and transcriptional control. *Trends Genet.* 12:351-355.
- O'Hagan, R.C., R.G.Tozer, M.Symons, F.McCormick und J.A.Hassell. 1996. The activity of the Ets transcription factor PEA3 is regulated by two distinct MAPK cascades. *Oncogene* 13:1323-1333.
- Orphanides, G., T.Lagrange und D.Reinberg. 1996. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 10:2657-2683.
- Pahl, H.L. und P.A.Baeuerle. 1996. Control of gene expression by proteolysis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:340-347.
- Pognonec, P., H.Kato und R.G.Roeder. 1992. The helix-loop-helix/leucine repeat transcription factor USF can be functionally regulated in a redox-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 267:24563-24567.
- Prota, G. 1988. Some new aspects of eumelanin chemistry. *Prog. Clin. Biol. Res.* 256:101-124.
- Ptashne, M. 1986. Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. *Nature* 322:697-701.
- Renkawitz, R. 1990. Transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Genet.* 6:192-197.
- Roberts, S.G. und M.R.Green. 1995. Transcription. Dichotomous regulators. *Nature* 375:105-106.

- Roeder, R.G. 1996. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* 21:327-335.
- Saito, H., K.Yasumoto, K.Takeda, K.Takahashi, A.Fukuzaki, S.Orikasa und S.Shibahara. 2002. Melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor isoform activates its own gene promoter through physical interaction with lymphoid-enhancing factor 1. *J. Biol. Chem.* 277:28787-28794.
- Sanger, F., S.Nicklen und A.R.Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 74: 5463
- Schartl, M. 1990. Homology of melanoma-inducing loci in the genus *Xiphophorus*. *Genetics* 126:1083-1091.
- Schonthal, A.H. 1995. Regulation of gene expression by serine/threonine protein phosphatases. *Semin. Cancer Biol.* 6:239-248.
- Serfling, E., A.Lubbe, K.Dorsch-Hasler und W.Schaffner. 1985. Metal-dependent SV40 viruses containing inducible enhancers from the upstream region of metallothionein genes. *EMBO J.* 4:3851-3859.
- Serluca, F.C., A.Sidow, J.D.Mably und M.C.Fishman. 2001. Partitioning of tissue expression accompanies multiple duplications of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase alpha subunit gene. *Genome Res.* 11:1625-1631.
- Sharp, P.A. 1992. TATA-binding protein is a classless factor. *Cell* 68:819-821.
- Struhl, K. 1991. Mechanisms for diversity in gene expression patterns. *Neuron* 7:177-181.
- Tang, H., X.Sun, D.Reinberg und R.H.Ebright. 1996. Protein-protein interactions in eukaryotic transcription initiation: structure of the preinitiation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:1119-1124.
- Tassabehji, M., V.E.Newton und A.P.Read. 1994. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat. Genet.* 8:251-255.

- dono, T., K.Yasumoto, K.Takeda, S.Amae, K.Watanabe, H.Saito, N.Fuse, M.Tachibana, K.Takahashi, M.Tamai und S.Shibahara. 2000a. Structural organization of the human microphthalmia-associated transcription factor gene containing four alternative promoters. *Biochim. Biophys. Acta* 1491:205-219.
- Udono, T., K.Yasumoto, K.Takeda, S.Amae, K.Watanabe, H.Saito, N.Fuse, M.Tachibana, K.Takahashi, M.Tamai und S.Shibahara. 2000b. Structural organization of the human microphthalmia-associated transcription factor gene containing four alternative promoters. *Biochim. Biophys. Acta* 1491:205-219.
- Ullrich, A. und J.Schlessinger. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203-212.
- Van de Peer, Y., J.S.Taylor, I.Braasch und A.Meyer. 2001. The ghost of selection past: rates of evolution and functional divergence of anciently duplicated genes. *J. Mol. Evol.* 53:436-446.
- Vandromme, M., C.Gauthier-Rouviere, N.Lamb und A.Fernandez. 1996. Regulation of transcription factor localization: fine-tuning of gene expression. *Trends Biochem. Sci.* 21:59-64.
- Volff, J. und M.Schartl. (im Druck) Evolution of signal transduction by gene and genome duplication in fish. *J. of Struct. and Funct. Genomics* 00: 1-12
- Wakamatsu, Y. 1981. Establishment of a cell line from platyfish-swordtail hybrid melanoma. *Cancer Res.* 41: 679-680
- Wakamatsu, Y., A.Oikawa, M.Obika, T.Hirobe und K.Ozato. 1984. Fish hereditary melanoma cell lines of different degrees of cell differentiation. *Dev. Growth Differ.* 26: 503-513
- Weis, S. und M.Schartl. 1998. The macromelanophore locus and the melanoma oncogene Xmrk are separate genetic entities in the genome of Xiphophorus. *Genetics* 149:1909-1920.

- Wellbrock, C., P.Fischer und M.Schartl. 1998. Receptor tyrosine kinase Xmrk mediates proliferation in Xiphophorus melanoma cells. *Int. J. Cancer* 76:437-442.
- Wellbrock, C., A.Gomez und M.Schartl. 1997. Signal transduction by the oncogenic receptor tyrosine kinase Xmrk in melanoma formation of Xiphophorus. *Pigment Cell Res.* 10:34-40.
- Wellbrock, C., R.Lammers, A.Ullrich und M.Schartl. 1995. Association between the melanoma-inducing receptor tyrosine kinase Xmrk and src family tyrosine kinases in Xiphophorus. *Oncogene* 10:2135-2143.
- Wellbrock, C. und M.Schartl. 1999. Multiple binding sites in the growth factor receptor Xmrk mediate binding to p59fyn, GRB2 and Shc. *Eur. J. Biochem.* 260:275-283.
- Winkler, C., J.Wittbrodt, R.Lammers, A.Ullrich und M.Schartl. 1994. Ligand-dependent tumor induction in medakafish embryos by a Xmrk receptor tyrosine kinase transgene. *Oncogene* 9:1517-1525.
- Wittbrodt, J., D.Adam, B.Malitschek, W.Maueler, F.Raulf, A.Telling, S.M.Robertson und M.Schartl. 1989a. Novel putative receptor tyrosine kinase encoded by the melanoma-inducing Tu locus in Xiphophorus. *Nature* 341:415-421.
- Wittbrodt, J., D.Adam, B.Malitschek, W.Maueler, F.Raulf, A.Telling, S.M.Robertson und M.Schartl. 1989b. Novel putative receptor tyrosine kinase encoded by the melanoma-inducing Tu locus in Xiphophorus. *Nature* 341:415-421.
- Wittbrodt, J., R.Lammers, B.Malitschek, A.Ullrich und M.Schartl. 1992. The Xmrk receptor tyrosine kinase is activated in Xiphophorus malignant melanoma. *EMBO J.* 11:4239-4246.
- Wu, M., T.J.Hemesath, C.M.Takemoto, M.A.Horstmann, A.G.Wells, E.R.Price, D.Z.Fisher und D.E.Fisher. 2000. c-Kit triggers dual phosphorylations, which couple activation and degradation of the essential melanocyte factor Mi. *Genes Dev.* 14:301-312.

- Yamamoto, H., T.Kudo, N.Masuko, H.Miura, S.Sato, M.Tanaka, S.Tanaka, S.Takeuchi, S.Shibahara und T.Takeuchi. 1992. Phylogeny of regulatory regions of vertebrate tyrosinase genes. *Pigment Cell Res.* 5:284-294.
- Yasumoto, K., S.Amae, T.Udono, N.Fuse, K.Takeda und S.Shibahara. 1998. A big gene linked to small eyes encodes multiple Mitf isoforms: many promoters make light work. *Pigment Cell Res.* 11:329-336.
- Yasumoto, K. und S.Shibahara. 1997. Molecular cloning of cDNA encoding a human TFEC isoform, a newly identified transcriptional regulator. *Biochim. Biophys. Acta* 1353:23-31.
- Yasumoto, K., K.Takeda, H.Saito, K.Watanabe, K.Takahashi und S.Shibahara. 2002. Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. *EMBO J.* 21:2703-2714.
- Yasumoto, K., K.Yokoyama, K.Shibata, Y.Tomita und S.Shibahara. 1994. Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol. Cell Biol.* 14:8058-8070.
- Yasumoto, K., K.Yokoyama, K.Takahashi, Y.Tomita und S.Shibahara. 1997. Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes. *J. Biol. Chem.* 272:503-509.
- Yokoyama, K., H.Suzuki, K.Yasumoto, Y.Tomita und S.Shibahara. 1994. Molecular cloning and functional analysis of a cDNA coding for human DOPachrome tautomerase/tyrosinase-related protein-2. *Biochim. Biophys. Acta* 1217:317-321.
- Yokoyama, K., K.Yasumoto, H.Suzuki und S.Shibahara. 1994. Cloning of the human DOPachrome tautomerase/tyrosinase-related protein 2 gene and identification of two regulatory regions required for its pigment cell-specific expression. *J. Biol. Chem.* 269:27080-27087.
- Zawel, L. und D.Reinberg. 1992. Advances in RNA polymerase II transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4:488-495.

## 10 Publikationen

JOACHIM ALTSCHMIED\*, **JACQUELINE DELFGAAUW\***, BRIGITTA WILDE, JUTTA DUSCHL, LAURENCE BOURNEAU, JEAN-NICOLAS VOLFF UND MANFRED SCHARTL: Subfunctionalization of Duplicate *mitf* Genes Associated With Differential Degeneration of Alternative Exons in Fish, *Genetics* 161, 2002

\* These authors contributed equally to this work

**JACQUELINE DELFGAAUW**, JUTTA DUSCHL, CLAUDIA WELLBROCK, MANFRED SCHARTL UND JOACHIM ALTSCHMIED: MITF-M Plays an Essential Role in Melanoma Specific Transcriptional Activation in *Xiphophorus*, in Vorbereitung

### Konferenzbeiträge:

STEFAN J. SCHERER, **JACQUELINE DELFGAAUW**, CONSTANZE KAISER, FLORIAN RAUSCHER, HANS K. MUELLER-HERMELINK, MANFRED SCHARTL UND BURKARD KNEITZ: Isolation and Characterization of the mouse-*mlh1* promoter region and transcriptional analysis

Molecular Mechanisms of Pathogenesis, Internationales Symposium, IZKF Würzburg, 11.- 13. April 2002

**JACQUELINE DELFGAAUW**, JOACHIM ALTSCHMIED, JUTTA DUSCHL UND MANFRED SCHARTL: MITF-M Plays an Essential Role in Melanoma Specific Transcriptional Activation in *Xiphophorus*

12<sup>th</sup> International Conference of the International Society of Differentiation, Lyon, 14.- 17. September 2002

## 11 Danke!

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Manfred Scharl bedanken, der es mir ermöglichte, unter seiner Leitung ein interessantes Thema zu bearbeiten. Außerdem danke ich ihm für die Hilfestellungen und konstruktiven Vorschläge, mit denen er mich während dieser Zeit unterstützte.

Bei Herrn Prof. Dr. Georg Krohne möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Dissertation bedanken.

Herrn PD Dr. Joachim Altschmied möchte ich ein ganz herzliches Dankeschön sagen! Ich möchte ihm für die tolle Einarbeitung in die Thematik und in die notwendigen Methoden, sowie für Anregungen und Ratschläge danken, die für das Fortschreiten dieser Arbeit unentbehrlich waren und dafür, dass er sich stets Zeit nahm für meine Fragen und Probleme.

Vor allem ihm und Frau Jutta Duschl habe ich die ersten schönen Monate hier zu verdanken, in denen ich in sehr netter und heiterer Umgebung sehr viel lernte. Auch bei der restlichen AG Scharl Truppe möchte ich mich für die äußerst nette Arbeitsatmosphäre bedanken, hier vor allem bei Stefan für die nette gemeinsame Zeit in B248, und bei Dunja für ihre Freundschaft und viele lustige Stunden auch außerhalb des Labors. Auch Reinhold, Torsten und Dirk danke ich für manch nettes Püschchen zwischendurch, gerade in den letzte Monaten meiner Arbeit. Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Mariko für witzige und vor allem leckere Sushi-Lehrstunden, sowie bei allen anderen für hier und da ein nettes Schwätzchen auf dem Gang. Frau Dr. Claudia Wellbrock danke ich für manch wertvollen Kommentar vor allem zu den Signaltransduktionsexperimenten, Christin für hilfreiche Tips im Labor und Petra für die Unterstützung in der Zellkultur.

Ein äußerst herzliches Dankeschön geht zu guter Letzt an meine Eltern, die mich immer vorbehaltlos unterstützten und motivierten, und meine Arbeit mit großem Interesse verfolgten.

Das Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Graduiertenkollegs „Regulation des Zellwachstums“ gefördert.

## 12 Lebenslauf

### ***Persönliche Daten:***

Name	Jacqueline Delfgaauw
Geburtsdatum	19. November 1971
Geburtsort	Baden-Baden
Staatsangehörigkeit	deutsch

### ***Schulbildung:***

1978 – 1982	Grundschule Dittelbrunn
1982 – 1991	Alexander-v.-Humboldt-Gymnasium, Schweinfurt Abschluß mit der Allgemeinen Hochschulreife

### ***Hochschulausbildung:***

1991 bis 1997	Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg; Studienschwerpunkte: Tier-/Tropenökologie, Humangenetik, Biotechnologie
März 1997	Diplom
April 1997 bis Jan. 1998	Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Würzburg bei Herrn Prof. U. Zimmermann Thema: Untersuchungen zur Mikroverkapselung von Zellen (Alginate in medizinischer Anwendung)
bis Dezember 1998	Anstellung als hilfswissenschaftliche Kraft am Lehrstuhl für Biotechnologie der Universität Würzburg bei Herrn Prof. U. Zimmermann
seit Februar 1999	Dissertation am Institut für Physiologische Chemie I der Universität Würzburg bei Herrn Prof. M. Scharl Titel: Melanomspezifische Genexpression bei <i>Xiphophorus</i> : Die Rolle des Transkriptionsfaktors Mitf

## **13 Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre hiemit an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und dabei keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher, noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsantrag urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 08. Januar 2003

Jacqueline Delfgaauw