

Philipps



Universität

Marburg

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

**Charakterisierung der Myc-Funktion durch Miz-1 interaktionsdefiziente
Myc-Mutanten**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin
dem Fachbereich der Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt
von

Carsten Frohme
aus Hanau am Main

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am 29.01.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. M. Eilers

Korreferent: PD Dr. A. Burchert

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	7
1.1 Tumorgenese	7
1.1.1 Onkogene	7
1.1.2 Beeinflussung des Zellzyklus	8
1.1.3 Initiation, Progression, Metastasierung	9
1.1.4 Adhäsion und Invasion	10
1.2 Der onkogene Transkriptionsfaktor Myc	11
1.2.1 Myc Struktur und Funktion	12
1.2.2 Die Funktion von Myc in Zellwachstum und Proliferation	15
1.2.3 Transkriptionale Repression durch Myc	16
1.2.4 Die Rolle der Myc-Überexpression	17
1.2.5 Die Myc-Funktion in der Tumorgenese	18
1.2.6 Zellzyklus und genomische Instabilität	19
1.2.7 Myc und der p19ARF-p53 Signalweg	20
1.3 Das Myc interacting Zinc finger protein-1 (Miz-1)	20
1.3.1 Miz-1 und ausgewählte Bindungspartner	21
1.3.2 Miz-1, Myc und p21Cip1 in der Differenzierung	22
1.4 High Density Synthetic Oligonukleotid-Array	22
1.4.1 Funktionsprinzip	23
1.4.2 Herstellung von Microarrays	24
1.4.3 Bioinformatische Auswertung von Microarray-Daten	26
1.5 Zielsetzung der Arbeit	28
2 Materialien	30
2.1 Materialien der Proteinchemie	30
2.1.1 Lysepuffer zur Herstellung von Lysaten	30
2.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford	30
2.1.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)	31
2.1.4 Antikörper für Western-Blotting	31
2.1.5 Reagenzien für Westernblotting	32

2.2	Materialien der Molekularbiologie	32
2.2.1	Bakterienstämme	32
2.2.2	Plasmid - DNS Vektoren	33
2.2.3	DNS-modifizierende Enzyme	34
2.2.4	Puffer für die Molekularbiologie	34
2.2.5	Medien für die Bakterienkultur	35
2.3	Materialien der Zellbiologie	35
2.3.1	Medien, Enzyme, Sonstiges	35
2.3.2	Materialien für die Immunfluoreszenz	36
2.3.3	Antikörper für die Immunfluoreszenz	36
2.4	Kommerzielle Kit-Systeme	37
2.5	Geräte	37
3	Methoden	38
3.1	Methoden der Proteinchemie	38
3.1.1	Zellaufschluss durch „Gefrieren und Auftauen“	38
3.1.2	Proteinbestimmung nach Bradford	38
3.1.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
3.1.4	Immunblot (Western-Blot)	39
3.2	Methoden der Molekularbiologie	40
3.2.1	Kultivierung von Bakterien	40
3.2.2	Transformation von Bakterien durch Hitzeschock	40
3.2.3	Analytische Präparation von Plasmid-DNS aus Bakterien im Mini-Maßstab	40
3.2.4	Präparative Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien im Maxi-Maßstab	41
3.2.5	Photometrische Nukleinsäure-Quantifizierung	41
3.2.6	Sequenzspezifische Hydrolyse von DNS mit Restriktions- endonukleasen	41
3.2.7	Ligation von DNS-Fragmenten	41
3.2.8	DNS-Gelelektrophorese	42
3.2.9	RNS-Gelelektrophorese	42
3.2.10	Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	42
3.2.11	Aufreinigung von DNS durch Ethanolpräzipitation	42

3.2.12	Aufreinigung und Konzentrieren von RNS	43
3.2.13	Isolieren von RNS	43
3.2.14	Expressions-Analyse	43
3.2.15	DNS-Biochips	43
3.3	Methoden der Zellbiologie	44
3.3.1	Allgemeine Bedingung für die Kultivierung von Säugerzellen	44
3.3.2	Passagieren von Zellen	44
3.3.3	Einfrieren von Zellen	45
3.3.4	Auftauen von Zellen	45
3.3.5	Bestimmung der Zellzahl	45
3.3.6	Transiente Transfektion nach der Kalziumphosphat-Methode	45
3.3.7	Retrovirale Infektion von Säugerzellen	46
3.3.8	Erstellen einer Wachstumskurve	47
3.3.9	Fluoreszenzaktiviertes Sortieren (Durchflusszytometrie)	47
3.3.10	Messung der Zellalterung	48
3.3.11	DNS-Immunfluoreszenz	48
4	Ergebnisse	50
4.1	Biologie der Miz-1-bindungsdefizienten Myc-Mutanten im Zellsystem	52
4.1.1	Subklonieren der Mutanten in pBabe-Vektoren	52
4.1.2	Die Mutationen MycV394D und MycS405F zeigen keinen signifikanten Wachstumsunterschied im Vergleich mit Mycwt	52
4.1.3	In Rat1-Zellen stimulieren Mycwt, MycV394D und MyS405F den Eintritt in die S- und G2-Phase	54
4.1.4	In der BrdU-Markierung zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Mycwt, MycV394D und MycS405F	56
4.1.5	Im Seneszenz-Assay kann MycV394D nicht länger die Zellalterung verzögern	57
4.2	Die Microarray-Analyse beschreibt Unterschiede in der Gen- regulation auf RNS-Ebene zwischen Mycwt und MycV394D	60
5	Diskussion	63
5.1	Ergebnisübersicht	63
5.2	Unterschiede und Übereinstimmungen im biologischen	65

Verhalten von Mycwt, MycV394D und MycS495F		
5.3	Potentielle Miz-1 Zielgene	66
5.3.1	p21Cip1 als direktes Zielgen von Miz-1 in der DNS-Schadensantwort	67
5.4	Die Verbindung zwischen Myc und p53	69
5.5	Myc und p57Kip2	73
6 Zusammenfassung		74
7 Abstract		76
8 Literaturverzeichnis		78
9 Anhang		85
9.1	Abkürzungsverzeichnis	85
9.2	Akademische Lehrer	87
9.3	Danksagung	88
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	89

1 Einleitung

1.1 Tumorgenese

1.1.1 Onkogene

Im Sinne eines Neoplasmas wird ein Tumor als gewebliche Neubildung in Form eines spontanen, verschiedengradig enthemmten, autonomen und irreversiblen Überschusswachstums von körpereigenem Gewebe, das in der Regel mit unterschiedlich ausgeprägtem Verlust spezifischer Zell- und Gewebefunktionen verbunden ist, definiert. Bei der Entwicklung einer Neoplasie lassen sich die Stadien Initiation, Progression, Proliferation, tumorabhängige Angiogenese, Invasion mit den Teilschritten Adhäsion, Degradation und Migration, Intravasation, Zirkulation, Extravasation und die Bildung metastatischer Tumorzellkolonien unterscheiden. Jeder dieser Schritte setzt die simultane oder sukzessive Aktivierung oder Inaktivierung bzw. den Verlust einer Reihe von Genen voraus (Webb et al., 2000).

Gene mit onkogener Potenz, sogenannte Protoonkogene, wurden als zelluläre Homologe viraler Onkogene identifiziert. Viren mit der Fähigkeit, *in vivo* oder *in vitro* menschliche und tierische Zellen neoplastisch zu transformieren, bezeichnet man als onkogene Viren. Onkogene Eigenschaften der Viren wurden erstmals 1911 beim Rous-Sarkom des Huhns nachgewiesen. Sie alle sind Mitglieder der Virusfamilien mit doppelsträngiger DNS oder der Retroviridae. Neoplasien durch Viren entstehen nur bei immuninkompetenten Organismen. Die Transformation erfolgt möglicherweise durch Dysregulation zellulärer Onkogene oder durch Einschleusung fremder Onkogene in die Zelle. Mit der menschlichen Tumorphathogenese werden unter anderem folgende Viren in Verbindung gebracht: humane Papillomaviren (Zervixkarzinom), Hepatitis-B/C-Virus (primäres Leberzellkarzinom), Retroviren (HTLV 1, 2; humane T-Zell-Lymphome), Epstein-Barr-Virus (Burkitt-Lymphom, Nasopharynx-Karzinom) (Knudson, 1991).

Die Protoonkogene sind durch ihre Genprodukte, den Onkoproteinen, an der Kontrolle normaler Wachstums- und Differenzierungsprozesse, insbesondere der Zellproliferation, beteiligt. Bis heute sind über 100 Onkogene verschiedenster funktioneller Gruppen beschrieben worden. Viele Proteinprodukte der zellulären Gene sind in Signaltransduktionswege eingebunden. Sie können als Wachstumsfaktoren, Rezeptor-Tyrosinkinasen, zytoplasmatische Tyrosinkinasen, regulatorische GTPasen,

zytoplasmatische Serin-Threonin-Kinasen, Adaptorproteine in der Signaltransduktion oder Transkriptionsfaktoren wirken (Hanahan et al., 2000). Besonders frühembryonal erfüllen sie Kontrollaufgaben, zum Beispiel im Trophoblasten der Plazenta für die Nidation des Eis, die Ernährung des Feten oder für die endokrine und immunologische Umstimmung des mütterlichen Organismus während der Schwangerschaft. Tumorsuppressorgene, sogenannte Antionkogene, kontrollieren die Wirkung der Protoonkogene. In Tumorzellen werden nach der onkologischen Genregulationstheorie aufgrund von veränderten Regulationsmechanismen zwischen Operator- und Regulatorgenen beziehungsweise nach der Mutationstheorie durch direkte Veränderungen am Operatorgen Protoonkogene zu Onkogenen. Die Onkogenhypothese besagt, dass diese in den Zellen vorhandene Information, die deren maligne Entartung bewirken kann, durch onkogene Viren und andere exogene chemische oder physikalische Kanzerogene, aber auch durch verschiedene endogene Faktoren wie das Altern oder Hormone sowie den Verlust von Tumorsuppressorgenen reaktiviert werden kann. Tumorsuppressorgene haben einen dämpfenden beziehungsweise reprimierenden Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus. Dabei wirken diese grundlegend über Mechanismen der Repression von für den Fortgang des Zellzyklus essentiellen Genen. Außerdem führen DNS-Schäden zu einem Teilungsarrest. Kann der Schaden nicht repariert werden, leitet die Zelle über die Aktivierung bestimmter Gen-Kaskaden den programmierten Zelltod ein (Sherr et al., 2000).

1.1.2 Beeinflussung des Zellzyklus

Der Zellzyklus selbst stellt eine Abfolge von Phasen der Zellreifung und -teilung dar. Die G1-Phase ist eine postmitotische Wachstumsphase, die auch als Präsynthesephase bezeichnet werden kann. Der Zeitraum nach der Mitose zeichnet sich durch kontinuierliche Erhöhung der RNS- und Proteinsynthese und Verdoppelung der Zentriolen aus. Um die genomische Integrität und präzise Verdopplung der Zellorganellen zu gewährleisten, muss die Zellteilung fehlerfrei ablaufen. Dazu verfügt die Zelle über sogenannte Checkpoints. Sie stellen sicher, dass bestimmte Ereignisse nur ablaufen, wenn vorausgegangene Prozesse sicher abgeschlossen sind. Besonders spielt hier das Tumorsuppressorgen p53 über die Induktion des *Cyclin depended Kinase-Inhibitors* p21CIP1 eine Rolle. Eine G1-Phase ohne nachfolgende S-Phase wird als G0- bzw. Ruhephase bezeichnet. Die Zellen nehmen am Zellzyklus nicht mehr teil, bleiben aber unter bestimmten Voraussetzungen zu erneuter Proliferation fähig. Die S-

Phase ist die DNS-Synthesephase (Reduplikation). Die DNS wird verdoppelt; aus einem Chromatinfaden werden zwei sogenannte Schwesterchromatiden, die am Zentromer zusammenhängen. In der prämitotische Vorbereitungsphase, der G₂- oder auch Postsynthesephase findet sich eine relativ kurze Periode, die als nochmaliger Checkpoint vor der nachfolgenden Teilung fungiert. In der Mitose, M-Phase, halbiert die Zelle ihren Chromatingehalt, es entstehen wieder zwei diploide Tochterzellen mit Einchromatidchromosomen. Auch in der M-Phase findet sich ein sogenannter Spindel-Checkpoint. Die Dauer eines Zellzyklus wird als Generationszeit bezeichnet (nach Trümper et al., 2004).

1.1.3 Initiation, Progression und Metastasierung

Im Stadium der Initiation wird die physiologische Homöostase zwischen natürlichem Zellverlust durch Apoptose und Zellvermehrung durch Proliferation gestört. Hierdurch erhält die mutierte Zelle einen Wachstumsvorteil. Weitere karyotypische, genetische und epigenetische Veränderungen, die durch die Instabilität der initiierten Zelle begünstigt werden, führen zur Tumor-Progression. Außerdem kommt es zur zunehmenden Entdifferenzierung von Tumorzellpopulationen. Dies führt zur Heterogenität innerhalb der von einer Ursprungszelle abstammenden Zellen, da entdifferenzierte Klone und deren Nachkommen gegenüber differenzierten einen zusätzlichen Wachstumsvorteil besitzen. Im Weiteren breitet sich der Tumor durch autokrine und parakrine Stimulation aus (Proliferation). Da die Diffusionstrecke einer Tumorzelle von einer sie ernährenden Kapillare maximal 250 µm betragen kann, kommt es zu Gefäßneubildungen. Das Gleichgewicht zwischen angiogenen und angiostatischen Stimuli ist zugunsten der letzteren verschoben. In den Endothelzellen wird die Trias von Motilität, Proteolyse und zellulärer Proliferation induziert. Zu den endogenen angiogenen Faktoren zählen unter anderem der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF). Damit Angiogenese induziert wird, müssen gleichzeitig Inhibitoren der Angiogenese herunterreguliert werden. Zu den potentesten Inhibitoren gehören Angiostatin, Plättchenfaktor 4, TGF-β und Gewebshemmer der Metalloproteinasen. Durch den angiogenen Stimulus werden Endothelzellen veranlasst, die Basalmembran zu zerstören, in das perivaskuläre Stroma zu invadieren und Gefäßsprossen in Richtung des angiogenen Stimulus voranzutreiben (Trümper et al., 2004). Die Invasion verläuft in drei Teilschritten:

- 1.) Anheftung der Tumorzellen an die extrazelluläre Matrix, die aus interstitiellem Stroma und Basalmembran besteht.
- 2.) Sekretion degradativer Enzyme, die die Bestandteile der interstiellen Matrix Typ-I-Kollagene, Proteoglykane und Fibronectine und die der Basalmembran Typ-IV-Kollagen, Laminin und Heparan-Sulfat-Proteoglykane zerstören.
- 3.) Schließlich die Migration der Tumorzellen in den Bereich der degradierten extrazellulären Matrix.

1.1.4 Adhäsion und Invasion

Die Tumorzellen schaffen sich über ihre Adhäsionsmoleküle die Voraussetzung in dem ihnen neuen Mikromilieu überleben zu können. Laminine wirken als sogenannte Bindemittel der extrazellulären Matrix. Sie binden über unterschiedliche Domänen mit hoher Affinität an Typ-IV-Kollagen und Proteoglykane sowie an spezifische Rezeptoren auf den Epithel- und Tumorzellen. Die Dichte an Lamininrezeptoren bestimmter Tumoren ist eng mit ihrer Invasivität verbunden. Insbesondere Tumoren mit hohem metastatischem Potential bilden selbst Laminin. Fibronectin ist wie Laminin ein multifunktionelles Adhäsionsmolekül. Über verschiedene Domänen kann es Kollagen, Fibrin, Proteoglykane und Hyaluronsäure an Integrine, spezifische Rezeptoren auf epithelialen Zellen, binden. Zusätzlich fungieren die Integrine als Bindeglieder zu Komponenten des Zytoskeletts und beeinflussen die Form der Zelle. Bei der Metastasierung spielen sie eine Rolle bei der Interaktion der Tumorzellen mit Thrombozyten, Endothelin, Fibrin, von-Willebrandt-Faktor und Thrombospondin. Im Weiteren zählen Cadherine zu den Adhäsionsmolekülen. Sie vermitteln die Ca^{2+} abhängige interzelluläre Adhäsion. Wahrscheinlich fungieren sie auch als Invasions-Suppressor-Moleküle, da ihre Expression umgekehrt proportional zur Invasionsfähigkeit der Tumorzellen ist. Die Adhäsion an, Degradation von und Migration in die interstitielle extrazelluläre Matrix gelingt auch benignen Tumoren. Aber nur maligne Neoplasien haben die Fähigkeit, die vorwiegend aus Typ-IV-Kollagen bestehende Basalmembran zu zerstören. Maligne Tumoren zeigen häufig eine gesteigerte Proteolyse. Zusammen mit der Motilität trägt dies zur erhöhten Invasivität bei. Die Aggressivität des Tumors korreliert ebenfalls mit der Expression von Heparanasen und Metalloproteasen, sowie mit dem Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ. Daneben sezernieren Tumorzellen auch Glukosidasen, sowie Elastase, Kathepsin und Plasmin. Die Abbauprodukte der Kollagene und Proteoglykane wirken

teilweise wiederum als Wachstums-, Angiogenese- und Chemotaxis-Faktoren. Nach der Zerstörung der Basalmembran wandern die Zellen aktiv durch die extrazelluläre Matrix, bis sie Zugang zu neugebildeten oder vorbestehenden Gefäßen finden. Chemotaktische Faktoren sind hierbei Kollagen-Peptide und Komplement-Faktoren des Wirtsorganismus. Zusätzlich finden sich autokrine Motilitätsfaktoren (AMF), die eine rasche Ausbildung von lappenförmigen Protoplasmaausstülpungen (Pseudopodien) mit erhöhter Expression von Matrixrezeptoren und Proteasen induzieren. Die Intravasation findet bevorzugt in einzellwandigen Kapillaren und Lymphgefäßen statt, die keine Basalmembran besitzen. An anderen Gefäßen erfolgt sie nach Adhäsion der Tumorzelle an das Laminin der Basalmembran. Während der Zirkulation invadierter Tumorzellen im peripheren Blut bilden diese häufig Aggregate mit Thrombozyten und Lymphozyten. Dies begünstigt die Überlebens- und Implantationsfähigkeit der Tumorzellen. Der Ort der Organmanifestation (Organotropie) im Rahmen der Extravasation wird durch die anatomischen Verhältnisse, wie der regionären Lymphdrainage und der Erstpassage durch primäre Kapillarfilter in Leber- und Lungenbett bestimmt. Außerdem spielen sowohl das organspezifische Expressionsmuster von Adhäsionsliganden und Rezeptoren auf Tumor- und Endothelzellen, als auch lokale Migrationsfaktoren, Hormone, Wachstums- und Angiogenesefaktoren eine Rolle. Die Metastasenbildung gelingt weniger als einer von 10.000 der zirkulierenden Tumorzellen. Sie erfordert eine erneute Angiogenese und Überwindung von Abwehrmechanismen, wie Makrophagen, natürlichen Killerzellen und T-Zellen (Trümper et al., 2004).

1.2 Der onkogene Transkriptionsfaktor Myc

Das myc-Gen wurde als konservierte Sequenz im Genom einer Gruppe von Vogel - Retroviren, genauer im retroviralen Hühnervirus MC29 (*myelocytomatosis transformig virus*), identifiziert (Sheiness et al., 1979). Diese Viren lösen in Hühnern Karzinome, Endotheliome, Sarkome sowie Leukämien aus. Zu diesem viralen myc (v-myc) fanden sich bald homologe, zelluläre Gegenstücke. Hierzu zählen zelluläres myc (c-myc), aber auch myc-ähnliche Gene wie das im Neuroblastom (N-myc) oder kleinzelligen Bronchial-Ca (L-myc) beschriebene (Schwab et al., 1984; Nau et l., 1985). Sie weisen eine ähnliche genomische Organisation wie c-myc auf, unterscheiden sich aber in der Expression. Die Proteine besitzen Regionen hoher Sequenzhomologie, auf die sich die funktionelle Verwandtschaft zurückführen lässt (Henriksson et al., 1996).

1.2.1 Myc Struktur und Funktion

Das Gen *c-myc* ist innerhalb des menschlichen Genoms auf Chromosom 8q24 lokalisiert (Steiner et al., 1996). Es umfasst drei Exons. Seine Translation kann an einem von drei Promotoren initiiert werden. Beginnt die Translation an der AUG-Startseite des zweiten Exons entsteht das häufigste, 439 Aminosäuren umfassende und 64 kDa schwere, *c-Myc*-Protein. Wird die Translation an alternativen Startpunkten initiiert, entsteht eine längere oder kürzere Variante des Proteins, *p67 Myc* beziehungsweise *MycS* genannt. Dieses sogenannte *cMycS* besitzt weiterhin sowohl ein nukleäres Lokalisationssignal, als auch die DNS-Bindungs- und Heterodimerisierungs-Domäne (Spotts et al., 1997). In manchen Tumoren finden sich hiervon hohe Mengen, deren Funktion bisher unklar bleibt. Das *Myc*-Protein wird Sauerstoff-gekoppelt glykosyliert oder phosphoryliert. Diese Modifikationen beeinflussen die spätere Lebensdauer des Proteins. Die *c-Myc*-Sequenz beinhaltet weitere konservierte N-terminale Domänen, die sogenannten *Myc-Boxen*, welche sich auch in den verwandten Proteinen *N-Myc* und *L-Myc* finden (Grandori et al., 2000).

Eine große Gruppe von Transkriptionsfaktoren ist durch das Vorkommen von Leucinresten in konservierten Positionen der Proteine gekennzeichnet. Die Leucinreste sind Bestandteil einer α -Helix, wobei sich in jeder zweiten Drehung der Helix auf der gleichen Seite ein konservierter Leucinrest befindet. Die langen Seitenketten der Leucinreste ragen aus der Helix heraus und assoziieren mit den Leucinresten einer anderen Helix. Durch diese reißverschlußartige Verbindung lagern sich zwei monomere Proteine zu einem Homo- oder Heterodimer zusammen. Die beiden parallel angeordneten α -Helices sind umeinander gewunden und bilden so ein „coiled coil“-Motiv, wie es auch in Faserproteinen, wie Keratin, gefunden wird. Das Motiv wird im Folgenden mit ZIP abgekürzt. Das Leucin-Zipper-Motiv ist zwar essentiell für die DNS-Bindung, es ist selbst jedoch nicht für die direkte Assoziation mit der DNS verantwortlich. Die DNS-Bindung geschieht vielmehr durch eine dem Leucin-Zipper benachbarte basische DNS-Bindungsdomäne. Der Leucin-Zipper vermittelt somit die Assoziation der Monomere, wodurch die korrekte Positionierung der beiden basischen DNS-Bindungsdomänen in dem dimeren Molekül ermöglicht wird. Neben dem Leucin-Zipper kann eine Dimerisierung von Transkriptionsfaktoren auch durch das sogenannte Helix-Loop-Helix-Motiv vermittelt werden. Dieses Motiv ist nicht mit dem Helix-Turn-

Helix-Motiv von Homöodomän-Proteinen zu verwechseln. Das Helix-Loop-Helix-Motiv ist durch zwei kurze amphipathische Helices gekennzeichnet, die in jeder dritten oder vierten Position eine hydrophobe Aminosäure aufweisen. Die Helices sind durch eine Aminosäuresequenz verbunden, in der sich eine oder mehrere Aminosäuren befinden, die die helikalen Strukturen aufbrechen. Die spezifische DNS-Bindung geschieht über basische Domänen, die zu denjenigen von Faktoren mit Leucin-Zipper homolog sind (ein Übersicht gibt Grandori et al., 2000).

Transkriptionsfaktoren mit basischen DNS-Erkennungsmotiven gehören zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die nur als Dimer aktiv sind. Aus der Dimerisierung verschiedener Untereinheiten ergeben sich komplexe Regulationsmöglichkeiten.

Die C-terminale Region von Myc besitzt ein Motiv zur Dimerisation, die Helix-Loop-Helix Leucin Zipper (HLH LZ) Domäne. Sie vermittelt die Homo- oder Heterodimerisation mit anderen HLH LZ – Proteinen. Die c-Myc-Dimerisations-Domäne ist für die zelluläre Transformation nötig. Als obligates Partner-Protein wurde das HLH LZ – Protein Max identifiziert. Die c-Myc RNS und ebenfalls das Protein zeigen eine kurze Halbwertszeit von etwa 30 min bzw. 20 min im Vergleich zu Max, ca. drei Stunden für die RNS bzw. länger als 24 Stunden für das Protein. Deshalb erscheint Myc als die limitierende und damit auch regulierende Komponente der Heterodimerisation. Die Bindung von Myc und Max an der HLH LZ – Domäne richtet die angrenzende basische Region so aus, dass sie an die spezifische hexanukleide, E-Box genannte, innerste DNS-Sequenz (5'-CACGTG-3') angreifen kann. Max kann ausserdem an ein anderes Protein der HLH LZ – Familie, Mad, das transkriptionelle Ruhe vermittelt, binden. Das Mad-Niveau, im Gegensatz zu Myc, steigt während der Differenzierung an. Die verminderte Expression von Mad2, auch als Mxi-1 benannt, wurde mit der Tumor-Entwicklung im Maus-Model in Verbindung gebracht.

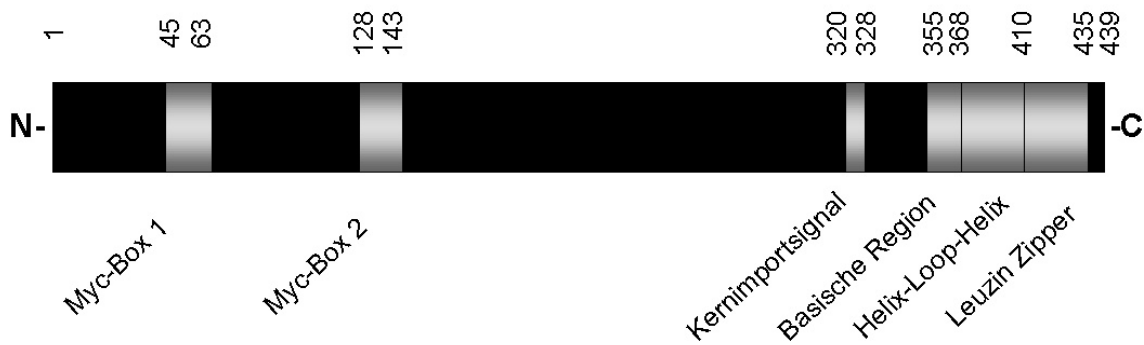


Abb.1: Darstellung der verschiedenen Domänen des Myc-Proteins. Die aminoterminalen TAD-Domäne (transcription activation domain) enthält zwei innerhalb der Myc-Familie konservierte Regionen, Myc-Box 1 und Myc-Box 2. An Aminosäureposition 320 liegt ein Kernimportsignal. Über die angrenzende basische Region (BR) ist Myc zur unmittelbaren DNS-Bindung fähig. Die Helix-Loop-Helix/Leuzin-Zipper- (HLH/LZ-) Domäne ist ein typisches Strukturmerkmal von Transkriptionsfaktoren.

Der an die DNS gebundene Myc/Max-Komplex aktiviert die Transkription durch die *transcriptional activation domain* (TAD), welche aus den 143 N-terminalen gelegenen Aminosäuren besteht. Ein kleiner Bereich dieser Region wird außerdem für die Myc-vermittelte transkriptionelle Repression benötigt. Die transregulatorische Region steuert also die Transformation und scheint gleichzeitig entscheidend für die Myc-vermittelte Repression zu sein. Somit ist es wahrscheinlich, dass die neoplastische Transformation sowohl die Aktivierung als auch die Repression durch Myc einschließt.

Das DNS-gebundene Myc/Max-Heterodimer interagiert durch die N-terminale Region von Myc mit einer großen Anzahl von in die Transkription eingebundenen Proteinen. Dies gilt auch für TRRAP, einen mit der Histonacetylase GCN5 assoziierten Komplex. Die Acetylierung von Histonen markiert das Chromatin, um den Transkriptionsfaktoren wie TFIIE und TBP, die zur universellen Transkriptions-Maschine gehören, Zugriff auf dieses zu verschaffen. Zu den anderen Myc-assoziierten Proteinen, die in die Regulation der Transaktivierung oder Transrepression durch Myc eingebunden sind, gehören p107 und Miz-1. Der Mad/Max-Komplex rekrutiert, im Gegensatz zum Myc/Max-Komplex, die Histon-Deacetylase, welche die Chromatin-Struktur verdichtet. Das limitiert den Zugriff von Transkriptionsfaktoren auf die DNS.

1.2.2 Die Funktion von Myc in Zellwachstum und Proliferation

Die Expression von c-myc in der normalen Zelle wird von externen Signalen fein reguliert. Hierzu gehören Wachstumsfaktoren, der Kontakt zur extrazellulären Matrix, interne Regulatoren und der Zellzyklus. Die ruhende Zelle weist wenig c-myc auf. Die stimulierte Zelle zeigt dagegen einen dramatischen Anstieg der c-myc Expression. Erhöhte c-myc Levels bleiben über das Durchlaufen des Zellzyklus hin bestehen. Erst in den resultierenden vorerst ruhenden Tochterzellen geht die Expression auf ein basales Niveau zurück. Abnormale oder ektope Expression von c-myc in primären Zellen aktiviert außerdem eine protektive Verschaltung über die Induktion von p19/p14ARF und p53, die zum programmierten Zelltod führt. Normale Zellen, die Myc überexprimieren, werden im gesunden Organismus durch Apoptose eliminiert, um der neoplastischen Entartung vorzubeugen. Für c-myc kennzeichnend ist die Expression in proliferierenden Zellen. Als immediate early response Gen kann seine Transkription in ruhenden Zellen (G0-Phase) durch Einwirken von Wachstumsfaktoren induziert werden. Eine artifizielle Überproduktion von Myc führt zu Wachstumsreiz-unabhängiger Proliferation und Blockade der terminalen Differenzierung (Eilers et al., 1991).

Die embryonale Entwicklung benötigt ein reguliertes Maß an c-myc und dessen verwandten Formen. Maus-Embryonen, welche beide Allele von c-myc durch homologe Rekombination verloren haben, versterben in der frühen embryonalen Phase, da sie einer Vorform der Hämatopoese entbehren. Gezieltes Gen-Replacement zeigt, dass N-myc c-myc in der Embryogenese ersetzen kann, was wahrscheinlich macht, dass die funktionelle Domäne von N-Myc räumlich identisch mit der von c-Myc ist. Homozygot negative Tiere für L-myc zeigen keinen charakteristischen Phänotyp, somit scheint L-myc nicht grundsätzlich erforderlich für die Embryogenese.

Fibroblasten von Raten-Zelllinien mit gezielt zerstörten Allelen beider c-myc Gene sind lebensfähig, aber deutlich in ihrem Wachstum beeinträchtigt. Die Abwesenheit nachweisbarer Level auch von N-myc oder L-myc in diesen Zellen, weisen daraufhin, dass Myc nicht essentiell für das Überleben der Zelle ist. Der c-myc-null-Phänotyp erscheint stabil und das ursprüngliche Erscheinungsbild lässt sich durch transgene Expression vollständig wiederherstellen. Exponentiell wachsende c-myc-defiziente

Zellen haben die gleiche Zellgröße und den gleichen rRNS- und Gesamtprotein-Gehalt wie ihre c-myc^{+/+} Vorläuferzellen. Allerdings ist die Menge an Gesamt-RNS und akkumuliertem Protein, genauso wie die Rate an degradiertem Protein reduziert. G1- und G2-Phase des Zellzyklus sind signifikant verlängert, der Eintritt in die S-Phase ist verspätet, die Dauer der S-Phase bleibt unbeeinflusst. Deutlich ist die Notwendigkeit von c-myc für den Eintritt in die G2-Phase (Mateyak et al., 1997).

1.2.3 Transkriptionale Repression durch Myc

Eine der ersten für Myc beschriebenen biologischen Funktionen war die Inhibition der Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten *in vitro*. Dieser Prozess wird nachweislich durch den Transkriptionsfaktor c/EBP-alpha kontrolliert (Freitag et al., 1992). Myc wirkt dabei oberhalb in der Regulationskette von c/EBP-alpha durch die Repression der endogenen c/EBP-alpha-Gene. Die exogen bewirkte Überexpression von c/EBP-alpha kann obenbeschriebene Repression wiederum aufheben. Die genauere Betrachtung zeigte, dass die Repression von c/EBP-alpha durch Myc am Kernpromotor, also an der Erkennungs- bzw. Bindungsregion für die RNS-Polymerase, von c/EBP-alpha erfolgt, was eine direkte oder indirekte Kontrolle des c/EBP-alpha-Promotors durch Myc erwarten lässt.

Es werden verschiedene Modelle zur Erklärung der Repression durch Myc diskutiert. Zum einen, dass Myc die Synthese von Repressoren der Transkription aktiviert und hierdurch indirekt am Kernpromotor wirkt. Dabei ist zu ergänzen, dass verschiedene Mutationen des Myc-Alleles beschrieben wurden, welche entweder die Möglichkeit zur Genaktivierung oder zur Genrepression beeinflussten. Daher wird vermutet, dass diese beiden Effekte von ihrem Mechanismus her getrennt erfolgen. Im Weiteren wurde eine direkte Interaktion der Proteine von Myc und Max mit der DNS-Sequenz an der Startseite des p27KIP2-Promotors nachgewiesen (Yang et al., 2001). Auf der anderen Seite wurden keine direkten Bindungen von Myc an andere durch Myc reprimierte Kernpromotoren gefunden. Eine dritte Möglichkeit besteht darin, dass Myc durch eine Protein-Protein-Interaktion an den Promotor gebunden wird, und keine direkten Kontakt mit der DNS aufnimmt. Proteine die hierfür in Frage kommen sind TFII-I (Roy et al., 1991), YY-1 (Shrivastava et al., 1993), Sp-1 (Gartel et al., 2001) und nicht zuletzt Miz-1 (Peukert et al., 1997).

Zurzeit werden Nachweise gesammelt, welche nahe legen, dass drei Gene, die für Inhibitoren der Zellzyklusregulation kodieren, p15INK4b, p21Cip1 und Mad4 durch die Interaktion von Myc und Miz-1 gehemmt werden. Miz-1 und Myc binden im lebenden Organismus gemeinsam nahe der Startcodons für die Gene p15INK4b und p21CIP1. Miz-1, nicht aber Myc, bindet direkt an spezifische DNS-Sequenzen aller drei Kernpromotoren. Im Weiteren ergänzt Miz-1 Myc an den Kernpromotor der Gene von p21CIP1 und p15INK4b. Miz-1 aktiviert die Expression aller drei Gene. Myc hemmt die Transaktivierung durch Miz-1 zum Teil durch die Konkurrenz um die Bindung an p300.

1.2.4 Die Rolle der Myc-Überexpression

Die Aktivierung des c-myc Gens taucht in verschiedenen Formen der Krebsentwicklung auf. Chromosomale Translokation, wie im Fall des Burkitt-Lymphoms, aktiviert den c-myc-Lokus durch Juxtaposition in die Nähe von Immunglobulin-Genen. Diese sind in B-Zellen transkriptionell hoch aktiv. Bei der Amplifikation vergrößert sich die Anzahl der myc-Gen Kopien, was anschließend ebenfalls zur vermehrten myc-Expression führt. So finden sich mehr als 200 Kopien pro Zelle von N-myc in Neuroblastomen oder mehr als 50 Kopien pro Zelle von c-myc, N-myc oder L-myc in Kleinzelligen-Bronchiolarkarzinomen. In kolorektalen Karzinomen scheint die Abwesenheit des APC-Proteins (Adenomatosis Polyposis Coli), das den transkriptionellen Coaktivator β -Katenin normalerweise bindet und inaktiviert, zu vermehrter myc-Expression zu führen. In anderen Neoplasien finden sich mutierte Formen von β -Katenin, die die Deregulation von myc bewirken.

Andere Mechanismen der c-myc Überexpression beinhalten das Fehlen der 3'UTR-Destabilisierungs-Sequenz, was die Erhöhung der myc-mRNS bewirkt. Die Insertion eines Retrovirus in die Nähe des myc-Lokus aktiviert die Expression über die retrovirale Regulator-Sequenz. Das Onkogen ras stabilisiert das Myc-Protein anhand eines Post-Translations-Modifikations-Mechanismus (Sears R. et al., 1999).

1.2.5 Die Myc-Funktion in der Tumorgenese

Wie oben schon angeführt sind zur Entwicklung eines Tumors verschiedene Alterationen im genetischen Programm der Zelle vorzusetzen. Hierzu zählen unter anderen die verminderte Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren, die Unterdrückung des programmierten Zelltods, eine verlängerte Lebensspanne und die Stimulation der Neoangiogenese (Hanahan et al., 2000).

Tumorzellen, die eine deregulierte Expression von Myc aufweisen, zeigen gleichzeitig einen geringeren Bedarf an externen Wachstumsfaktoren (Keath et al., 1984). Auch ohne diese sind sie in der Lage in die S-Phase einzutreten und die Mitose zu durchlaufen (Eilers et al., 1991).

Die Fähigkeit von Myc als Onkogen zu wirken konnte anhand der Transformation durch Cotransfektion von c-myc und ras in Ratten-Embryonen nachgewiesen werden. Wenn immortalisierte Rat1-Fibroblasten manipuliert werden c-myc zu überexprimieren, überwinden sie die Kontaktinhibition, wie es sich auch in Tumorzellen zeigt. Transgene Tiere mit gewebsgezielter Expression von c-myc führten zu gewebsspezifischer Entwicklung von Tumoren. *In vivo* zeigt die transgene konditionale Induktion von c-myc in Keratinozyten und hämatopoetischen Zellen reversible Proliferation und klonale Expansion, gleichsam ein Hauptmerkmal in Neoplasien.

Unterschiedliche Modelle liefern Erklärung für den Einfluss von Myc auf das Fortschreiten des Zellzyklus, den Metabolismus, die Apoptose und die genomische Instabilität. Eine Möglichkeit wäre die Beschleunigung des Durchlaufs der G1 und S-Phase des Zellzyklus durch Überwinden der Checkpoints und Beschleunigung des Zellstoffwechsels. Nur durch zusätzliche Mutationen jedoch führen diese Veränderungen nicht zu Apoptose oder Nekrose der Zelle, sondern zu neoplastischen Transformation.

Weiteres Verständnis soll die Konzentration auf direkte und indirekte Zielgene von Myc bringen. Als direkte Zielgene werden solche bezeichnet, deren Expression durch die direkte Bindung von Myc verändert werden. Aktivieren diese Myc-aktivierten Gene weitere, werden diese als indirekte Zielgene von Myc bezeichnet.

Um die Zielgene des onkogenen Transkriptionsfaktor c-Myc zu identifizieren, wurden unter anderem *serial analysis of gene expression* (SAGE) nach adenoviraler Expression von c-Myc in primären humanen Endothelzellen der Nabelvene durchgeführt. Die Induktion der gefundenen Gene wurde mithilfe von Microarray-Analysen und rt-PCR verifiziert. Unter den gefundenen Genen war das für einen Aktivator der Translations-Initiation kodierende und für die Inhibition der Neovaskularisation bekannte p67. C-Myc induzierte die Zellzyklus regulierenden Gene CDC2-L1, Cyclin E binding protein und Cyclin B1; außerdem die DNS Reperaturgene BRCA1, MSH2 und APEX. Dies gibt Hinweis darauf, dass Myc die DNS-Replikation an die Prozesse der Erhaltung der genomischen Integrität koppelt. Der Max-Bindungspartner Mnt, ein Antagonist zu Myc, war im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus hochreguliert (Menssen et al., 2002). *In vivo* Experimente mit Chromatin-Immuno-Präzipitationen bewiesen darüber hinaus, dass Myc die Promotoren für CDK4, Prohibitin, Mnt, Cyclin B1 und Cyclin E binding protein 1 direkt besetzte.

Wichtig ist, zwischen der Art und Weise zu unterscheiden, in welcher die Zielgene innerhalb der normalen Homöostase der Zelle reguliert oder im Rahmen pathophysiologischer beziehungsweise neoplastischer Zustände überexprimiert werden.

1.2.6 Zellzyklus und genomische Instabilität

Das Entfernen von c-myc durch homologe Rekombination hinterlässt Zellen, die deutlich verlängerte Verdopplungszeiten aufweisen. Das verlangsamte Wachstum scheint zu der verminderten Fähigkeit der Zelle zu führen ohne Myc in den Zellzyklus einzutreten. Dies würde für die Kontrolle durch Myc über den Eintritt der Zelle in den Zellzyklus sprechen. Die meisten Studien konzentrieren sich auf die Effekte hinsichtlich der regulatorischen Proteine, die die Transition von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus steuern. Diese Transition wird unterstützt, wenn die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) durch die Assoziation mit spezifischen Cyclinen aktiviert wurden. CDK-Inhibitoren unterbinden diese Aktivierung. C-Myc wurde mit der Induktion von Cyclin D1 und D2, Cyclin E, CDK 4, und der Phosphatase cdc25A, einem Aktivator von CDK2 und CDK4, in Zusammenhang gebracht. Außerdem vermindert c-Myc die Menge beziehungsweise inhibiert die Funktion von p27, ebenfalls ein CDK-Inhibitor,

wahrscheinlich durch die Zunahme der Cyclin D-Level, die zur Sequestrierung von p27 führen. Nicht zuletzt induziert c-Myc Cull1, das die Degradation von p27 vermittelt.

1.2.7 Myc und der p19ARF-p53 Signalweg

Sowohl in etablierten primären Mausembryofibroblasten (MEF), als auch in kontinuierlich wachsenden Zelllinien findet sich ein Verlust der Tumorsuppressoren p53 oder p19ARF. Sie agieren in einem gemeinsamen biochemischen Signalweg. Myc aktiviert in primären MEFs die Expression von p53 über p19ARF. Somit steuert Myc auch den programmierten Zelltod bei replikativen Unregelmässigkeiten. Mausembryofibroblasten, die eine Überexpression von Myc überstehen, das heißt bei denen keine Induktion der Apoptose stattgefunden hat, weisen Mutationen von p53 oder einen Verlust von p19ARF während der Etablierung auf. Sie werden als immortale Zellen bezeichnet. In diesem Sinn zeigen MEFs mit Verlust des p19ARF oder p53 Gens verminderte apoptotische Reaktion auf Myc und Wachstum, dass auch ohne die Stimulation durch Wachstumsfaktoren fortbesteht (Zindy et al., 1998). Daraus folgt, dass p19ARF einen p53-abhängigen Checkpoint des Zellzyklus reguliert und ebenfalls als Tumorsuppressor gegen hyperproliferative beziehungsweise onkogene Signale wirkt.

1.3 Das Myc interacting Zinc finger protein-1 (Miz-1)

Myc transformierte Zellen sind unter anderem charakterisiert durch den Verlust der Expression bestimmter Gene. Myc reprimiert demnach die Genexpression. Im *Hefe-Two-Hybrid-Screen* konnte ein POZ (Poxvirus und Zinkfinger)-Domänen Zink Finger Protein beschrieben werden, das speziell mit Myc, nicht aber mit Max oder USF interagiert. Es wurde mit Miz (Myc interacting Zinc finger protein) und in Erwartung weiterer homologer Gene mit 1 benannt. Das Miz-1 Gen ist auf Chromosom 1 in der Region 1p36.1 bis 1p36.2 lokalisiert (Tommerup et al., 1995). Es kodiert für ein 803 Aminosäure großes Peptid. Das Molekulargewicht beträgt zwischen 90 und 105 kDa. Im Westernblot zeigen sich drei spezifische Banden, die sich wahrscheinlich auf unterschiedliche Phosphorylierungen zurückführen lassen. Miz-1 bindet an die Startseite des Adenovirus *major late* und des Cyclin D1 Promotors und aktiviert die Transkription beider Promotoren. Miz-1 hat eine potente Wachstumsarrest-Funktion. Für die Bindung von Myc und Miz-1 ist sowohl die Helix-Loop-Helix Domäne von Myc, als auch eine kurze amphipathische Helix, welche im Carboxy-Terminus von Miz-1 lokalisiert ist,

nötig. Der N-Terminus von Miz-1 wird durch eine konservierte POZ-Domäne von 108 Aminosäuren gebildet. Die in vielen Proteinen vorkommende POZ-Domäne vermittelt die Protein-Protein-Interaktion. Eine häufig beobachtete Homodimerisierung an solchen Domänen, scheint auf Miz-1 jedoch nicht zuzutreffen. Als lösliches Protein findet sich Miz-1 im Zytoplasma, im Zellkern liegt es, an Myc gebunden, in Kernaggregaten vor (Peukert et al., 1997). Im Zentrum des Miz-1 Proteins finden sich zwölf, in Tandemformation folgende, Zink-Finger-Motive. Ein dreizehntes Motiv liegt weiter in Richtung des C-Terminus. Die Zink-Finger können sowohl an verschiedene DNS-Sequenzen, als auch an Proteine binden.

Die Überexpression von Miz-1 löst in humanen Zellen und in Nagerzellen einen Wachstumsarrest aus. Die Myc-Expression *in vivo* unterdrückt die Transaktivierung durch Miz-1 und überwindet den Miz-1-induzierten Wachstumsarrest (Peukert et al., 1997). Konstitutive Knock-out-Mäuse zeigen eine Letalität in der frühen Embryonalzeit, die mit einer erhöhten Apoptoserate einhergeht. Die Miz-1-deletierten Embryonen sind kleiner als vergleichbare wild Typ Exemplare, während heterozygote Mäuse in den ersten zwei Jahren keinen auffälligen Phänotyp aufweisen (Adhikary et al., 2003).

1.3.1 Miz-1 und ausgewählte Bindungspartner

Miz-1 fördert die Expression des cyclin-dependent kinase (CDK) Inhibitors p15^{ink4b} durch Bindung an das Initiator-Element des p15^{ink4b} Promotors. Myc und Max bilden einen Komplex mit Miz-1 am p15 Initiator und unterdrücken so die transkriptionale Aktivierung von Miz-1. Die Myc-Expression in primären Zellen inhibiert die Akkumulation von p15^{ink4b}, die sich im Zusammenhang mit der Zellalterung (Seneszenz) findet. Umgekehrt zeigt sich in etablierten Zelllinien mit homozygotem Verlust von c-myc eine vermehrte Expression von p15^{ink4b}. Miz-1 interaktionsdefiziente-Varianten von c-myc sind nicht in der Lage eine Akkumulation von p15^{ink4b} mRNA in primären Zellen zu unterbinden und in der Folge die Zellalterung zu überwinden (Staller et al., 2001). Der tumor-growth factor- β (TGF- β) ist ein Zytokin, welches den Stop epithelialer Zellteilung durch Herunterregulieren des Protoonkogens c-myc bewirkt. Gleichzeitig kommt es zur Expression von CDKs wie p15^{ink4b}. Dies erreicht TGF- β indem es die Rekrutierung von Miz-1 durch Myc unterbindet. TGF- β induziert außerdem den Smad-Protein-Komplex, der die Region oberhalb des p15^{ink4b}-Promotors erkennt und Miz-1 bindet. Somit nutzt TGF- β zwei

unabhängige Weg, die Smad-vermittelte Transaktivierung und das Unterbinden der Myc-Repression, um die Aktivierung des p15^{ink4b} Promotors zu kontrollieren.

1.3.2 Miz-1, Myc und p21Cip1 in der Differenzierung

An der Differenzierung epithelialer Zellen Dickdarms hat der Wnt-Signaltransduktionsweg entscheidenden Anteil (Theodosiou et al., 2003). Dabei wird die Konzentration von c-myc, hier ein Zielgen des Signalwegs, über die Regulation von β -Catenin und die Beeinflussung der TCF-Aktivität herunterreguliert (van de Wetering et al., 2003). In der Folge wird die Hemmung von Miz-1 durch Myc gemindert und dadurch die Expression von p21cip1 verstärkt. Myc und Miz-1 binden in proliferierenden epithelialen Kolonzellen an den Kernpromotor (*core-Promotor*) von p21Cip1. Dagegen nimmt in epithelialen Kolonzellen die Menge an gebundenem Myc ab, während die Menge an gebundenem Miz-1 gleich bleibt.

Auch in hämatopoetischen Zellen kann Myc die für die Differenzierung entscheidende p21Cip1-Expression über Miz-1 inhibieren (Wu et al., 2003). Die Miz-1-Expression steigt dabei im Verlauf der Differenzierung an, während die Myc-Expression abnimmt. Auch hier wurde die Aktivierung des p21Cip1-Promotors durch Miz-1 und die Myc-bezogenen Repression auf den *core-Promotor* eingegrenzt.

Mad4, Mitglied der Mad-Familie im Myc-Max-Mad-Netzwerk, ist ein Protein, das in der terminalen Differenzierung verschiedener Zellen hoch exprimiert wird. In der Arbeit von Kime et al. (2003) konnte es als direktes Zielgen von Miz-1 identifiziert werden. Der Mad4-Promotor selbst wird hierbei von Miz-1 induziert und Myc-abhängig reprimiert.

1.4 High Density Synthetic Oligonukleotid-Array

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte bei der Entwicklung von Ultrahochdurchsatz-Techniken zur Datenerfassung in den Biowissenschaften erzielt. Schnelle Sequenzierungstechniken ermöglichten die nahezu vollständige Entschlüsselung des menschlichen Genoms und einiger weiterer Modellorganismen.

Der nächste konsequente Schritt in Richtung auf ein vollständiges Verständnis des synergetischen Zusammenspiels der molekularen Bestandteile des Organismus ist die Entschlüsselung des Transkriptoms und des Proteoms. Eine hierfür geeignete Technik, besonders zur parallelen Massendatenerfassung der RNS-Mengen sehr vieler Gen-

Transkripte, ist die in den letzten Jahren weiter perfektionierte *Microarray*-Technik. Die Auswertung der hierbei anfallenden sehr großen Datenmengen stellt die Wissenschaft vor Probleme, denen durch eine weitergehende Automatisierung, auch des Auswertungsprozesses, begegnet wird.

1.4.1 Funktionsprinzip

Die *Microarray*-Technik basiert auf der Hybridisierung von Nukleinsäuren. Komplementäre Nukleinsäure-Einzelstränge lagern sich dabei spezifisch über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen ihren Purin- und Pyrimidin-Basen aneinander. Auf einer Immobilisierungsmatrix wie beschichteten Glas-Objektträgern, Siliziumchips oder Nitrozellulose-Membranen immobilisiert man an definierten Positionen Nukleinsäuren zu untersuchender Gene bekannter Sequenz, die sogenannten Proben-Nukleinsäuren. Diese hybridisieren dann mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Target-Nukleinsäuren aus verschiedenen zu untersuchenden Geweben oder Gewebekonditionen.

Die im Gewebe vorhandenen Target-Nukleinsäuren werden nach Abwaschen unspezifisch gebundener Target-Nukleinsäuren über einen Fluoreszenz-*Scanner* durch den Ort der Hybridisierung auf dem Chip identifiziert. Über das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten für die Markierungen der zu vergleichenden Target-Samples charakteristischen Wellenlängen werden diese dann quantifiziert. *Microarrays* mit besonders kleiner meist siliziumbasierter Immobilisierungsmatrix, auf der die Proben-Nukleinsäuren besonders dicht aufgetragen sind, nennt man *Microarray*-Chips. Wenn ein vollständiges Genom auf einem Chip untersucht werden kann spricht man vom Genom-Chip. Dieser Begriff schließt die zunehmend wichtiger werdende Protein-Chip Technik mit ein. Eine allgemeine Bezeichnung für alle *Microarray*-Typen ist Bio-Chip. Nach der immobilisierten Proben-DNS unterscheidet man auch Format I *Microarrays*, bei denen 500 bis 5.000 Basen lange cDNS immobilisiert wird und Format II *Microarrays*, bei denen 20 bis 25 Basen lange Oligonukleotide als Proben-DNS dienen. Diese können *in situ* direkt auf dem Chip synthetisiert oder erst synthetisiert und dann auf dem Chip immobilisiert werden. Sind die Nukleinsäure-Spots kleiner als 250 µm, spricht man auch von hochauflösenden *Microarrays*.

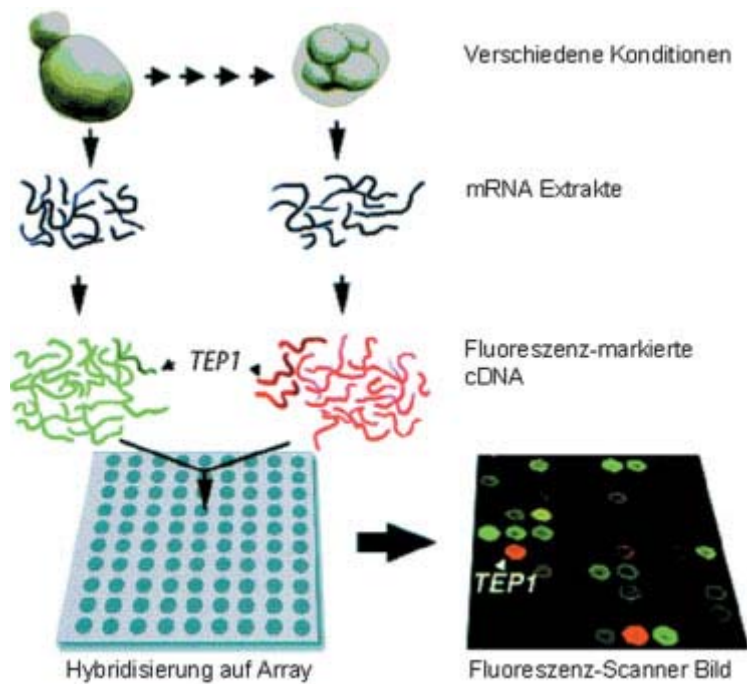
1.4.2 Herstellung von Microarrays

Ein kommerzieller Anbieter von Microarrays, die Firma Affimetrix, benutzt eine photolithographische Festphasen-Synthese oder *Very Large Scale Immobilized Polymer Synthesis* (VLSIPS) genannte Technik der Herstellung (Lipshutz et al., 1999). Photolabile Schutzgruppen auf Glassubstrat werden durch Licht, das selektiv durch eine photolithografische Maske strahlt, lokal für die *On-the-spot*-Oligosynthese aktiviert.

Das Glassubstrat wird dann mit einer photolabilen DNS-Base geflutet, die an die vorher beleuchteten Arraystellen binden. Für die nächsten Positionen werden dann entsprechend andere photolithographische Masken benutzt und der Vorgang wiederholt. Für jede Base im Proben-Oligo werden also vier Masken benötigt. Der Vorteil ist die direkte Herstellung auf dem Chip, wodurch das mechanische Spotten entfällt. Proben-Sequenzen müssen nicht extrahiert, sondern können direkt aus bekannten Sequenzdatenbanken abgeleitet werden. Die normierte Herstellungsweise der Affimetrix-Microarrays trägt zu einer Standardisierung der Expressionsanalyse und der Ergebnisse bei.

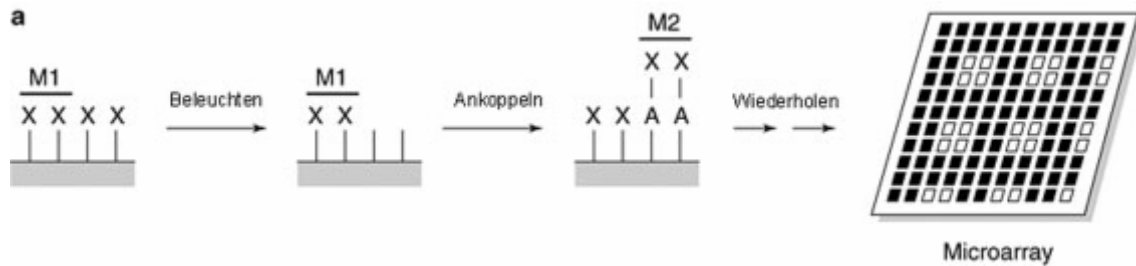
Genfunktionen sind nicht ausschließlich durch die sie kodierenden Sequenzen determiniert, sondern auch durch die räumliche und zeitliche Expressionskontrolle der die Gene unterliegen. Microarrays bieten die Möglichkeit, die Transkriptmengen aller Gene eines Organismus, das heißt das gesamte Transkriptom parallel und damit die Dynamik der Genexpression zu analysieren (DeRisi et al., 1997). Für die Hochdurchsatz-Expressionsanalyse mit Microarrays werden aus Datenbanksequenzen abgeleitete Oligonukleotid-Proben auf dem Array immobilisiert.

Diese werden mit markierten cDNS-Targets aus den zu untersuchenden Geweben hybridisiert. Zur Herstellung der cDNS-Targets wird die mRNA extrahiert, aufgereinigt und über reverse Transkriptase mit fluoreszenz-markierten Nukleotiden in markierte cDNS-Targets umgeschrieben. Expressionsanalysen erlauben Vergleiche von Transkriptmengen verschiedener Gewebe beziehungsweise die Überwachung der zeitlichen Veränderung der Genexpression im. Bei letzteren, als Zeitserien-Analysen gestalteten Expressionsanalysen erhält man Expressions-Profile der Gene über die Zeit (Schober, 2002).



Der schematische Ablauf eines Mikroarray-Experimentes. (Abbildung modifiziert nach Brown et al., 1999)

Die Affymetrix-Technologie benutzt ein lichtgesteuertes Syntheseverfahren zur Konstruktion von sehr dichten DNS-Sonden-Arrays. Dabei werden zwei Techniken kombiniert. Die Photolithographie und die Festphasen-DNS-Synthese. Synthetische Verbindungen werden mit photochemischen Gruppen, welche wiederentfernbar schützende Anteile besitzen versehen und auf eine Glassfläche aufgeheftet. Im Weiteren wird per Licht über eine photolithographische Maske auf den entsprechenden Orten auf der Oberfläche eine lokale Photodeprotektion erzeugt. Die erste Serie von chemischen Bausteinen, Hydroxyl-geschützte Desoxyribonukleoside, werden mit der entstandenen Oberfläche inkubiert. Verbindungen entstehen nur an den Stellen, die im vorhergehenden Schritt beleuchtet, und somit deprotektiert wurden. Als nächstes werden über eine neue Maske andere Orte beleuchtet. Der vorherige chemische Durchgang wird wiederholt.



Photolithografische Festphasen-Synthese (Abbildung modifiziert nach Schober 2002)

Fluoreszenz markierte Nukleinsäuren Proben werden in die Hybridisierungs-Kammer injiziert, damit sie sich komplementären Oligonukleotiden anlagern. Durch die Rückseite des Glass-Trägers applizierte Laser-Impulse führen zur Fluoreszenz-Emissionen, welche gesammelt und gefiltert werden. Letztlich entsteht ein quantitatives, zweidimensionales Bild der Hybridisierungs-Intensität.

1.4.3 Bioinformatische Auswertung von Microarray-Daten

Microarrays liefern ihrem parallelen Ultrahochdurchsatz-Anspruch gemäß extrem große Datenmengen. Allein eine Hybridisierung ergibt oft mehr als zehn Werte pro Spot. Neben der relativen Fluoreszenzintensitäten sind oft viele statistische Werte zur Beurteilung der Datengüte vorhanden. Diese Datenmengen können trotz modernster Datenbank-Management-Systeme nicht vollständig von Menschen ausgewertet werden. Schon bei der Bildverarbeitung kommt eine automatische Auswertung zum Einsatz. Ein hybridisiertes Microarray mit Spots verschiedener Intensitäten muss nach dem sogenannten *Grid-Alignment* an die Spots über einen A/D-Wandler (Analog-Digital-Umsetzer) in eine numerische Tabelle mit Intensitätswerten umgewandelt werden. Hierbei muss beispielsweise eine Bestimmung der auswertbaren Größe der Spots auf dem Array unter Berücksichtigung von Fluoreszenz-Inhomogenitäten innerhalb der Spotfläche erfolgen. Durch die Bildverarbeitung werden zahlreiche Daten zur Merkmal/Artefakt-Differenzierung und statistische Qualitätsparameter generiert. Dazu gehört auch die Normierung der Genexpressions-Werte etwa anhand eines Vergleiches mit stets vorhandenen Haushaltsgenen. Ein weiteres wichtiges Gebiet ist das Datamining genannte semi- bis vollautomatische Aufdecken aussagekräftiger Strukturen in den großen Datenmengen. Zur Reduzierung der Dimensionalität beziehungsweise Komplexität der Ergebnisse werden Gruppierungsverfahren eingesetzt, die Gene in überschaubare Gruppen, sogenannte Cluster mit ähnlichen Expressionsmustern aufteilen. Solche Expressionsprofil-Alignments fassen co-

exprimierte Gene zusammen, die ähnliche zelluläre Funktionen haben können, oder durch ähnliche Mechanismen reguliert werden. Auf Basis ihrer Expressionsprofile fallen viele Gene unbekannter Funktion mit Genen bekannter Funktion in dieselben Cluster, was Rückschlüsse über deren Funktion ermöglicht (Schober, 2002).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das Studium des c-Myc Proteins hat seine Wurzeln in einfachen, aber grundlegenden Beobachtungen die vor über 90 Jahren von Peyton Rous gemacht wurden. Dabei entwickelte sich ein Verständnis bezüglich der Rolle von Myc als Protoonkogen. Mittlerweile wird es als zentrale, onkogene Veränderung betrachtet, die eine große Zahl von zellulären Funktionen durch die Änderung der Gen-Expression reguliert. Das Repertoire der zellulären durch Myc beeinflussten Funktionen reicht vom Zellzyklus über den Zellmetabolismus bis zur Apoptose.

Das an E-Boxen bindende Myc-Max Heterodimer beziehungsweise bivalente Myc-Max-Heterotrimer stellt den Mechanismus dar, über welchen Myc Gene aktiviert (siehe Ausführung 1.2). Allerdings kann Myc auch E-Box-unabhängig an die DNS binden (Staller et al., 2001) und weitere Gene reprimieren (Coller et al., 2000; Menssen et al. Hermeking, 2002). Es konnten Myc-bindende Transkriptionsfaktoren gefunden werden, auf welche Myc einen reprimierenden Einfluss hat. Eines dieser beschriebenen Proteine ist der Transkriptionsfaktor Miz-1. In den Arbeiten von Staller et al. und Seoane et al. konnte 2001 gezeigt werden, dass Miz-1 den Zellzyklusinhibitor p15^{ink4b} zusammen mit Smad-Proteinen in Reaktion auf TGF- β aktiviert.

Das zentrale Werkzeug zur weiteren Charakterisierung der Interaktion zwischen Myc und Miz-1 stellen in dieser Arbeit Punktmutanten des zellulären Myc dar. Diese Mutanten sollen selektiv nicht mehr mit Miz-1 interagieren können. Gleichzeitig aber durfte die Bindung und Transaktivierung der Gen-Expression durch den Myc/Max-Di- oder Tetramer-Komplex nicht beeinflusst sein.

Schon Staller et al. haben mit chimären Proteinen aus dem N-Terminus von Myc und dem C-Terminus von Mad einen ähnlichen biochemischen und biologischen Ansatz verfolgt. Für die konkrete Deskription des Myc-Max-Miz-1-Komplexes in der Biologie der Zelle waren diese jedoch zu artifiziell.

Die folgende Arbeit bezieht sich auf die, bereits in der Diplomarbeit von Vincent Beuger (2000) beschriebenen Punktmutanten von c-myc: MycV394D und MycS405F. Im ersten Teil soll mit diesen ein Nachweis für die erhaltene biologische Aktivität der mutierten Gene anhand des Wachstumsverhaltens und der Zellzyklus-Phasen-Verteilung beziehungsweise Aktivität erbracht werden.

Einen weiteren Ansatz bietet die Untersuchung der Zellalterung durch die Myc-Miz-1-Interaktion. Findet sich in einem entsprechenden Zell-System ein signifikanter Unterschied zwischen dem Wildtyp von Myc und einer der Miz-1-interaktionsdefizienten Myc-Mutanten eröffnet sich der Ansatz für einen Vergleich der RNS-Muster mithilfe einer Microarray-Analyse. Die hier durch eine Änderung der Expression auffälligen Gene müssen dann bezüglich ihrer Relevanz diskutiert werden. Gegebenenfalls können diese Ergebnisse in Bezug zu bereits bekannten Regulationswegen gebracht werden und weiteren Aufschluss über den Komplex des Myc-Netzwerkes liefern.

2 Materialien

Soweit nicht separat aufgeführt, wurden Chemikalien in Analysequalität beziehungsweise in Qualität zu molekularbiologischen Verwendung über die Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt) oder Applichem (Heidelberg) bezogen. Feinchemikalien mit höchstem Reinheitsgrad, sowie Zellkulturmedien und andere Chemikalien für die Zellkultur wurden von der Firma Sigma (Deisenhofen) oder Gibco Life Technologies (Karlsruhe) geliefert. Andere Lieferanten werden nachstehend aufgeführt.

2.1 Materialien der Proteinchemie

2.1.1 Lysepuffer zur Herstellung von Lysaten

Lysepuffer	150 mM NaCl 1% (v/v) NP-40 50 mM Tris-Puffer pH 8,0 Lagerung 4°C
Proteaseinhibitor	Aprotinin 5 mg/ml in PBS pH 7,4, Roche Biochemica Leupeptin 5 mg/ml in Aqua dest., Roche Biochemica Pepstatin 1 mg/ml in Methanol, Roche Biochemica Phenylmethylsulfonylfluorid 0,2 M in Ethanol Dithiothreitol (DTT) 1M in Aqua dest.

2.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford Reagenz	0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, BRL 4,75% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Orthophosphorsäure in Aqua dest. (filtriert und lichtgeschützt gelagert)
Referenz-Stocklösung zur Proteinbestimmung	Bovines Serum-Albumin (Fraktion V) 1 mg/ml Stammlösung in Aqua dest. oder im Puffer der Messprobe
Sonstiges	0,1 M NaCl-Lösung

2.1.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

Sammelpuffer	0,5 M Tris/HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl pH 8,8 0,4% (w/v) SDS 8 mM EDTA
2% lineares Polychrylamid	
Laufpuffer	25 mM Tris 0,2 M Glycin 0,1% (w/v) SDS
Acrylamidstammlösung	30% (w/v) Acrylamid 0,8% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid in Aqua dest.
APS	Ammoniumpersulfat 10% (w/v) in Aqua dest.
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Isopropanol	absolut, Riedel de Haen
3x SDS Probenpuffer	4,8 ml 4x Trenngel-Puffer 0,6 g SDS (6% SDS) 0,42 ml DTT (0,3 M DTT) kleine Spatelspitze Bromphenolblau 3,5 ml Glycerin ad 10 ml in Aqua dest.
Molekulargewichtsmarker	<i>full range Rainbowmarker</i> RPN 800, Amersham

2.1.4 Antikörper für Western-Blotting

anti-hMyc	9E10; monoklonaler Maus-Antikörper (Evan et al., 1985); 1:2500 eingesetzt
anti-Cdk2	polyklonaler Kaninchen-Antikörper M-2, Santa Cruz; 1:3000 eingesetzt
anti-p53	1:500 eingesetzt
anti-p19ARF	polyklonaler, anti-Maus Kaninchen-Antikörper R562, Abcam; 1:2000 eingesetzt

Sekundäre Antikörper

anti-Kaninchen	Peroxidase konjugierter affinitätsgereinigter Ziege-Antikörper, Dianova; 1:3000 eingesetzt
anti-Maus	Peroxidase konjugierter affinitätsgereinigter Ziege-Antikörper, Dianova; 1:3000 eingesetzt

2.1.5 Reagenzien für Westernblotting

Blotpuffer	10% (v/v) Methanol 150 mM Glycin 20 mM Tris-Base
Blocklösung	5% (w/v) Magermilchpulver 0,2% Tween-20 in 1x TBS (filtriert und bei 4°C gelagert)
20x TBS pH 7,4	1 M Tris/HCl 3 M NaCl
TBS-T pH 7,4	20% (v/v) 20x TBS pH 7,4 0,2% Tween-20
Methanol	absolut; zur Behandlung der PVDF-Membran
PVDF-Membran	Immobilon-P Transfer Membran, Milipore
Entwicklerlösung	ECL Westernblotting Detektionsreagenz 1 und 2, Amersham ECL-plus Westernblotting Detektionssystem Lösung A und B, Amersham
Film	ECL Hyperfilm, Amersham

2.2 Materialien der Molekularbiologie

2.2.1 Bakterienstämme

XL-Blue	E.coli recA1 endA1 gyra96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F'proAB lac ^q SÄ M15TN10 (Tet ^r)] ^c
DH5 (superkompetent)	E.coli F ⁻ Ö80dlacZÄM15 Ä(lacZYAargF)U169 deoR recA1 endeA1 hsdR17(r _K ⁱ ,m _K ⁺)phoAsupE44 e ⁻ thi-1gyr A96 relA1

2.2.2 Plasmid - DNS Vektoren

pBluescript II KS +/- MycV394D	prokaryontischer Vektor zur Klonierung von DNS-Fragmenten, Stratagene (Heidelberg), enthält c-myc (1320 bp) mit der angegebenen Punktmutation
pBluescript II KS +/- MycS405F	prokaryontischer Vektor zur Klonierung von DNS-Fragmenten, Stratagene (Heidelberg), enthält c-myc (1320bp) mit der angegebenen Punktmutation
pBabe (empty vector)	Vektor zur Herstellung rekombinanter Retroviren in Phoenix-Zellen mit Resistenzen gegen Puromycin beziehungsweise Hygromycin
pBabe Puro Myc WT	Vektor zur Herstellung rekombinanter Retroviren in Phoenix-Zellen mit Resistenzen gegen Puromycin, enthält c-myc (1320 bp)
pBabe Puro Myc V394D	Vektor zur Herstellung rekombinanter Retroviren in Phoenix-Zellen mit Resistenzen gegen Puromycin, enthält c-myc (1320 bp) mit der angegebenen Punktmutation
pBabe Puro Myc S405F	Vektor zur Herstellung rekombinanter Retroviren in Phoenix-Zellen mit Resistenzen gegen Puromycin, enthält c-myc (1320 bp) mit der angegebenen Punktmutation
pBabe Hygro Myc WT	Vektor zur Herstellung rekombinanter Retroviren in Phoenix-Zellen mit Resistenzen gegen Hygromycin, enthält c-myc (1320 bp)
pBabe Hygro Myc V394D	Vektor zur Herstellung rekombinanter Retroviren in Phoenix-Zellen mit Resistenzen gegen Hygromycin, enthält c-myc (1320 bp)
pBabe Hygro Myc S405F	Vektor zur Herstellung rekombinanter Retroviren in Phoenix-Zellen mit Resistenzen gegen Hygromycin, enthält c-myc (1320 bp)

pBabe H2B-GFP	Vektor zur Herstellung rekombinanter Retroviren in Phoenix-Zellen zur Expression von grün fluoreszierendem Protein (GFP)
---------------	--

2.2.3 DNS-modifizierende Enzyme

Restriktionsendonukleasen,	Amersham (Freiburg)
Restriktionspuffer	Gibco Life Technologies (Karlsruhe) New England Biolabs (Frankfurt am Main)
T4-DNS Ligase,	Amersham (Freiburg)
Ligasepuffer	

2.2.4 Puffer für die Molekularbiologie

6x Probenpuffer für Agarosegel	50% (v/v) Glycerol 0,42% (w/v) Bromphenolblau 0,42% (w/v) Xylencyanol
1x TE	10 mM Tris/HCl pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM EDTA pH 8,0
1x TAE	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA pH 8,0
0,5x TBE	45 mM Tris-Borat 2 mM EDTA pH 8,0
STET	8% (w/v) Saccharose 0,5% (v/v) Triton X-100 50 mM EDTA 50 mM Tris/HCL pH 8,0
Lysozym	10 mg/ml in Aqua dest.
Na-Acetat	5 M in Aqua dest., pH 5,2
Na-Acetat	3 M in Aqua dest., pH 4,8
Isopropanol	absolut, Riedel de Haen
Ethanol	absolut; oder 80% respektive 70% (v/v) in Aqua dest.

2.2.5 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 3 g Glucose auf 1000 ml in Aqua dest.
LB-Agar	LB-Medium 1,5% (w/v) Bacto-Agar

2.3 Materialien der Zellbiologie

2.3.1 Medien, Enzyme, Sonstiges

Vollmedium	500 ml DMEM mit Phenolrot
Serum	50 ml FCS
Serum (Phoenix)	50 ml Supreme U.S. Origin, BioWhittaker
Trypsin/EDTA	gebrauchsfertige Lösung (1x)
Selektionsantibiotika	Puromycin, eingesetzt bis zu 5 µg/ml Hygromycin, eingesetzt 200 µg/ml
PBS	130 mM NaCl 3 mM KCL 6,4 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM NaH ₂ PO ₄ mit HCl auf pH 7,2 respektive pH 7,4 eingestellt
DMSO	Dimethylsulfoxid 100%
Medium zum Einfrieren	DMEM-Vollmedium 20% FCS 10% DMSO
2x HBS	280 mM NaCl 50 mM HEPES 1,5 mM Na ₂ HPO ₄
Polybren	Hexadimethrinbromid
Plastikwaren	Kulturschalen sowie andere Einwegartikel für die Zellkultur wurden über die Firmen Greiner oder Nunc bezogen

Säugerzellen

Rat1	Rattenfibroblasten-Zelllinie (Topp, 1981)
Rat1 <i>c-myc</i> ^{-/-}	c-myc defiziente Rattenfibroblasten-Zelllinie (Mateyak, 1997)
Mefp53 ^{+/-}	murine, primäre, embryonale Fibroblasten, heterozygot für p53 (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von H. Karsunky, Universität Essen und P. Krimpenfort, Niederländisches Krebsforschungszentrum Amsterdam, NL)
Phoenix ^{eco}	humane Packaging-Zelllinie zum Erstellen rekombinanter, ekotropher Retroviren (Gringani et al., 1998)

2.3.2 Materialien für die Immunfluoreszenz

Propidiumiodid	interkalierender DNS-Farbstoff, Stock: 1 mg/ml
RNase A	25 mg/ml
Immunfluoreszenz	
Formaldehyd	3,7% Paraformaldehyd in PBS pH 7,4 unter erhitzen gelöst und filtriert
Glycin	0,1 M in PBS
NP-40	0,1% in PBS
NP-40 plus FCS	5% FCS 0,1% NP-40 in PBS
NaOH	2 M in Aqua dest.
DAPI	4,6-Diamin-2-Phenylindol, Stock: 5 mg/ml
Mounting Medium	70% (v/v) Glycerin in PBS

2.3.3 Antikörper für die Immunfluoreszenz

anti-BrdU	monoklonaler,affinitätsgereinigter	Maus-Antikörper; 1:3 eingesetzt
anti-Maus Cy3 TM gekoppelt	monoklonaler, affinitätsgereinigter	Ziege-Antikörper, Dianova; 1:100 eingesetzt

β -Galaktosidase Färbung

Glutardialdehyd	0,5% (v/v) in PBS pH 7,2
MgCl ₂	1 mM in Aqua dest.
X-Gal-Lösung	0,12 mM K ₃ [Fe(CN) ₆] 0,12 mM K ₄ [Fe(CN) ₆] 1 mM MgCl ₂ in PBS pH 6,0

2.4 Kommerzielle Kit-Systeme

Plasmid Maxi Kit	Qiagen-tip 500, Qiagen
RNS-Isolationskit	RNeasy Mini Kit, Qiagen
DNase-Verdau	RNase-free DNase Set, Qiagen

2.5 Geräte

Sterilarbeitsbank	Heraeus HeraSafe
Begasungsbrutschrank	Heraeus BBD 6220
Schüttelinkubator Model G25	New Brunswick Scientific Co.INC
Mikrokühlzentrifuge	Heraeus
Minifuge	Biofuge, Heraeus Fresco
Megafuge 1.OR	Heraeus
Mini-Transluminator	Biorad
Luminometer	Lumat LB 9507, Berthold
Mikroskop	DMIRB, Leica
Transblot SD Apparatur	Biorad
FACS	FACScalibur, Becton-Dickinson

3 Methoden

3.1 Methoden der Proteinchemie

3.1.1 Zellaufschluss durch „Gefrieren und Auftauen“

Nach Entfernen des Mediums wurde der Zellrasen einmal mit kaltem PBS (4°C) gewaschen, die Zellen mit 1 ml kaltem PBS und einem Schaber mechanisch abgelöst. Nach Zentrifugieren in einem Reaktionsgefäß für 2 min 2.000 rpm (Mikrokühlzentrifuge) und 4°C wurde der Überstand entfernt und das Zellsediment in 100 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,8), aufgenommen. Die Zellen wurden durch dreimaliges Einfrieren in flüssigen Stickstoff und Auftauen bei 37°C aufgeschlossen und für 10 min bei 13.000 rpm (Mikrokühlzentrifuge) und 4°C zentrifugiert.

3.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde die von Bradford beschriebene Methode genutzt. Dazu wurde ein Aliquot der Proteinlösung (1-10 µl) mit 100 µl 150 mM NaCl und 1 ml Bradfordlösung versetzt. Gleichzeitig wurde in derselben Weise eine Eichkurve mit definierten Konzentrationen an BSA erstellt (1-10 µg/µl). Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde anhand einer Geradengleichung errechnet (Bradford M.M., 1976).

3.1.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen aus Zelllysaten erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen. Amphotere Moleküle wie Proteine können im elektrischen Feld, je nach Ladungsüberschuss, als Kationen oder Anionen wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird von der Höhe der Ladungen und der Grösse der Proteine bestimmt. Durch den Siebeffekt einer hydrophilen Matrix können die in freier Lösung auftretenden Geschwindigkeitsunterschiede noch verstärkt werden. Inerte Gele mit variabler Porengrösse für die Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) werden durch Ko-Polymerisation von Acrylamid mit N.N'-Methylenbisacrylamid erzeugt. Der Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) erhöht die Löslichkeit, stabilisiert und verbessert die Trennung. Die aufzutrennende Proteinlösung wurde jeweils mit 3xSD Probenpuffer versetzt, für fünf min bei 100°C inkubiert und

nach kurzem Zentrifugieren auf das Gel aufgetragen. Bei einer angelegten Spannung zwischen 40 und 250 V lässt man die Proben das Trenngel durchlaufen. Die Laufzeit ist abhängig von der Spannung und betreffenden Proteingrösse. Sie entscheidet über den Auftrennungsgrad, der anhand eines mitlaufenden Grössenstandards nachvollzogen werden konnte. Die aufgetrennten Proteinbanden konnten mittels Immunblot bzw. spezifischer Antikörper sichtbar gemacht werden.

3.1.4 Immunblot (Western-Blot)

Mit dieser Technik lassen sich sowohl Antigene als auch Antikörper identifizieren. Die Präparation wurde, wie oben beschrieben, in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die direkte Antikörperexposition der Banden im Gel wurde nicht angewandt, da die Antikörper schlecht in das Polyacrylamidgel diffundieren und so grosse Antikörpermengen benötigt würden. Bei dem verwendeten Membran-Material handelte es sich um die PVDF-Membran Immobilon-P des Herstellers Milipore aus Nitrozellulose. Zunächst wurde die Membran auf die entsprechende Grösse zugeschnitten, eine Minute in Methanol (100%), zwei Minuten in Aqua dest. und weiter fünf Minuten in Blot-Puffer eingelegt. Die Übertragung der Proteinbanden erfolgte durch elektrophoretische Elution. Die Membran wurde in Kontakt mit dem Gel gebracht und durch Anlegen eines elektrischen Feldes von 22 V für 30 min gelangten die Proteine zur Membran (Elektroblotting). Hierdurch nahmen die Proteine die gleiche Position ein, die sie im Gel belegten. Zu Identifizierung des vermuteten Antigens im Blot wurde die Membran mit blockierendem Reagenz (hier Trockenmilch) behandelt, um die unspezifische Adhäsion der Antikörper zu reduzieren. Anschliessend wurde die Membran mit den primären Antikörpern (in angemessener Verdünnung) in Blocklösung drei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Darauf folgten mehrere Waschschritte mit TBS-T. Der sekundäre Antikörper wurde 1:3000 in Blocklösung verdünnt. In dieser erfolgt die Inkubation der Membran für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen wurde die Membran mit ECL™-Reagenzien nach den Angaben des Herstellers entwickelt. Die mit Peroxidase erzeugte Chemolumineszenz liess sich auf geeignetem ECL™ Hyperfilm nachweisen. Die Exposition dauerte nach zu erwartender Signalstärke zwischen einer Sekunde und mehreren Stunden. Die Schwärzung des Films verhält sich in bestimmten Grenzen proportional zur Menge an gebundenem Antikörper und somit proportional zur Menge an nachzuweisendem Protein.

3.2 Methoden der Molekularbiologie

Restriktionsverdau von DNS, Ligation von DNS-Fragmenten, Transformation von E.coli-Sicherheitsstämmen, Subklonieren von DNS-Fragmenten und Isolation von Plasmid-DNS im Mini- und Maxipräparationsmassstab wurden nach Standardmethoden durchgeführt, wie sie in „Molecular Cloning: a Laboratory Manual“ (J. Sambrook, E.T. Fritsch, T. Maniatis, 1989) detailliert nachzulesen sind.

3.2.1 Kultivierung von Bakterien

Für die Amplifikation von Plasmid-DNS wurde der E.coli-Sicherheitsstamm XL-1 blue eingesetzt. Bei ungenügender Ausbeute wurden die superkompetenten E.coli DH5 α verwendet. Die Kultivierung erfolgt im LB-Medium mit oder ohne 100 μ g/ml Ampicillin bei 37°C im Schüttelinkubator.

3.2.2 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

Transformationskompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und das gewünschte Plasmid (1 μ g) oder der Ligationsansatz (gesamter Ansatz) zugegeben. Die Bakterien wurden für 30 min auf Eis inkubiert, dann 60 s bei 42°C hitzegeschockt und wiederum 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 μ l LB-Medium ohne Ampicillin wurde die Kultur für 30 min bei 37°C in einen Schüttelinkubator eingebracht und anschliessend entweder in eine Flüssigkultur überführt oder auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen.

3.2.3 Analytische Präparation von Plasmid-DNS aus Bakterien im Mini-Maßstab

1,5 ml einer angeimpften Übernachtskultur von transformierten E.coli wurde für 1 min bei 3.000 rpm (Minifuge) abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 350 μ l STET-Puffer mit 250 μ g aufgenommen und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Suspension für 40 sec bei 95°C gekocht und für 10 min bei 13.000 rpm (Minifuge) und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit einem autoklavierten Zahnstocher entfernt, der Überstand mit 420 μ l Isopropanol und 40 μ l 3 M Natrium-Acetat versetzt und erneut bei 13.000 rpm (Minifuge) und 4°C abzentrifugiert. Nach der DNS-Fällung wurde das Pellet einmal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 μ l TE pH 8,0 oder Aqua dest. aufgenommen.

3.2.4 Präparative Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien im Maxi-Maßstab

Um grössere Mengen eines Plasmides zu gewinnen, wurden 400 ml einer E.coli-Übernachtskultur gemäss den Angaben des Herstellers für den Plasmid-Maxi Kit verarbeitet. Die sedimentierten Bakterien wurden in 10 ml Puffer A (beinhaltet RNase A) suspendiert, mit Puffer B lysiert und die Reaktion mit Puffer C abgestoppt. Nach Zentrifugation wurde der klare Überstand auf die gebrauchsfertige Anionenaustauschersäule gegeben und mit Puffer gewaschen. Nach Elution mit Puffer E wurde die DNS mit Isopropanol gefällt und mit Ethanol (70%) gewaschen. Das luftgetrocknete DNS-Pellet wurde in 200 bis 400 µl Aqua dest. aufgenommen und die Konzentration nach photometrischer Bestimmung mit Aqua dest. auf 1 µg/µl eingestellt.

3.2.5 Photometrische Nukleinsäure-Quantifizierung

Zur Bestimmung der DNS- bzw. RNS-Konzentration einer wässrigen Lösung wurde die Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette (Schichtdicke 1 cm) bestimmt. Für DNS berechnet sich der Gehalt: $c[\mu\text{g/ml}] = A_{260} \cdot 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$. Für RNS berechnet sich der Gehalt: $c[\mu\text{g/ml}] = A_{260} \cdot 40 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$. Um Absorption im Bereich von 0,1 bis 1,0 zu erhalten, wurden standardmässig Verdünnungen von 1 zu 200 benutzt. Durch Bestimmung des Quotienten A_{260}/A_{280} kann die Reinheit einer DNS-beziehungweise RNS-Präparation abgeschätzt werden.

3.2.6 Sequenzspezifische Hydrolyse von DNS mit Restriktionsendonukleasen

Die sequenzspezifische, enzymatische Hydrolyse mithilfe von Restriktionsendonukleasen erfolgt unter den vom jeweiligen Hersteller vorgegebenen Puffer- und Inkubationsbedingungen. Das Volumen der eingesetzten Restriktionsenzymlösungen überschritt in keinem Fall 1/10 des Gesamtvolumens des Ansatzes, um die Reaktion durch das in der Enzymlösung enthaltene Glycerin nicht zu beeinträchtigen.

3.2.7 Ligation von DNS-Fragmenten

Zur kovalenten Verknüpfung von DNS-Fragmenten wurde das Enzym T4-DNS-Ligase eingesetzt. Die Reaktion wurde gemäss den vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Inkubationsbedingungen durchgeführt. 10 bis 50 ng des linearisierten Plasmides wurden zusammen mit einem bis zu zehnfachen Überschuss des eingesetzten DNS-Fragmentes inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 Unit T4-DNS-Ligase in einem Gesamtvolumen

von 15 µl bei 16°C für 15 bis 20 Stunden durchgeführt.

3.2.8 DNS-Gelelektrophorese

Für die Analyse von Plasmiden, die Überprüfung von Restriktionen und die Aufreinigung von DNS-Fragmenten wurde die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Je nach Grösse der Fragmente wurde die Agarosekonzentration von 0,8% bis 1,2% (w/v) in TAE-Puffer gewählt. Die entsprechende Menge Agarose wurde aufgekocht und nach Abkühlung mit Ethidiumbromid versetzt und in einen geeigneten Gelträger gegossen. Die DNS-Proben wurden mit 1/6 Volumen Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt bei 100 V. Die DNS-Fragmente wurden durch Fluoreszenz des interkallierenden Farbstoffes Ethidiumbromid bei Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte mittels Video-Photographie.

3.2.9 RNS-Gelelektrophorese

Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an die RNS-Gelelektrophorese. Es wurde eine Agarosekonzentration von 1,2% (w/v) in TBE-Puffer gewählt. Die RNS-Proben wurden mit 0,5 µl 1xSDS versetzt und 10 min bei 65°C inkubiert. Anschliessend wurden Ethidiumbromid und Ladepuffer zu je einem Volumenanteil von 1/10 beigemischt.

3.2.10 Extraktion von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNS-Fragmente wurden die Banden gewünschter Grösse aus dem Gel ausgeschnitten und bei -20°C in einem mit Glaswolle präparierten PCR-Reaktionsgefäss tiefgefroren. Durch Zentrifugieren bei 3.000 rpm (Mikrokühlzentrifuge) wurde das tiefgefrorene Agarosestück mechanisch zerstört. Aus der entstandenen klaren Lösung wurde die DNS mithilfe der Ethanolpräzipitation aufgereinigt.

3.2.11 Aufreinigung von DNS durch Ethanolpräzipitation

DNS/Protein-Gemische in wässriger Lösung wurden mit 1/10 Volumen 5 M Na-Acetat sowie 2,5fachem Volumen Ethanol absolut versetzt und 15 min bei 3.000 rpm (Mikrokühlzentrifuge) und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit Ethanol (70%) gewaschen, getrocknet und in einem geeigneten Volumen Aqua dest. oder TE-Puffer aufgenommen.

3.2.12 Aufreinigung und Konzentrieren von RNS

Präparierte RNS in wässriger Phase wurde mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 4,8 sowie 2,5fachem Volumen Ethanol absolut versetzt und 15 min bei 3.000 rpm (Mikrokühlzentrifuge) und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschliessend wurde das Pellet wiederholt mit Ethanol (80%) gewaschen, und die gewünschte Konzentration mithilfe photometrischer Kontrolle eingestellt. Das Pellet wurde in RNase-freiem Wasser (DEPC-Wasser) verwahrt.

3.2.13 Isolieren von RNS

Zur Isolierung von Total-RNS wurde das Kitsystem RNeasy und RNase-free DNase der Firma Qiagen / Hilden verwandt. Die RNS wurde über ein Membransystem auf Basis eines Silikongels aufgereinigt. Kontaminierende DNS wurde mit Unit DNase hydrolisiert und danach mit verschiedenen Puffern nach Angaben des Herstellers gewaschen und eluiert. Die RNS wurde in DEPC-Wasser aufgenommen bzw. die mit DEPC-Wasser eluierte RNS wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Überprüfung der Integrität der RNS wurde eine Elektrophorese auf einem TBE-Agarosegel durchgeführt. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Für die weitere Verwendung auf dem Affymetrix®-Microarray-System wurde die RNS mittels Ethanolfällung auf eine Konzentration von 2,5 µg/µl eingestellt.

3.2.14 Expressions-Analyse

Für die RT-PCR-Analyse wurde totale zelluläre RNS mit einem RNeasy Kit (Quiagen) isoliert. Die first-strand cDNS wurde mit der SuperScript II reverse transcriptase und des Oligo(dT)12-18 primers (Invitrogen) erstellt. Für die Microarray-Analyse wurde aus DNS mithilfe des BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit (Enzo Diagnostics, Santa Clara) biotinylierte cRNS synthetisiert. Die markierte cRNS wurde unter Gebrauch des RNeasy Mini Kit (Quiagen) aufgereinigt. Die Fragmentation der cRNS, die Hybridisierung auf den MGU74Av2-Microarray, Färbung und Abtasten des Arrays im GeneArray-Scanner wurde nach den Vorgaben von Affymetrix® durchgeführt. Zur Analyse wurde die Analysis Suite 4.0 Software verwandt.

3.2.15 DNS-Biochips

DNS-Biochips ermöglichen die Expression einer sehr hohen Anzahl von Genen

simultan zu messen. So kann die transkriptionelle Aktivität einer Zelle in verschiedenen physiologischen Zuständen analysiert und verglichen werden. Zum Einsatz kam die Technologie der Firma Affymetrix®, Santa Clara (USA), die ein aus der Halbleiterindustrie entlehntes photolithographisches Verfahren, mit dem Oligonukleotide direkt auf einer Glasoberfläche synthetisiert werden, nutzt. Der DNS-Chip enthält für jedes Gen 20 verschiedene Oligonukleotide aus der exprimierten Sequenz und eine weitere Gruppe von 20 Oligonukleotiden mit einem fehlerhaften Nukleotid, einem sogenannten Mismatch. Der hier verwendete Chip MGU74Av2 enthält Oligonukleotide, die 6000 Maus-Gene repräsentieren. Zur Hybridisierung an diese Oligonukleotide wird zunächst aus polyA⁺ RNS eine doppelsträngige cDNS hergestellt, von der *in vivo* unter Einbau biotinylierter Nukleotide eine cRNS hergestellt wird. Die Markierung hybridisierter cRNS/DNS Komplexe erfolgt durch eine Bindung von Steptavidin gekoppeltem Phycoerythrin. Das Hybridisierungssignal kann so durch Fluoreszenzaktivierung in einem speziellen Lesegerät gemessen werden.

3.3 Methoden der Zellbiologie

Die Arbeiten mit eukaryontischen Zellkulturen orientiert sich im Wesentlichen an Standardmethoden, wie sie zum Beispiel bei Spector (Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1998) beschrieben wurden.

3.3.1 Allgemeine Bedingung für die Kultivierung von Säugerzellen

Alle Arbeiten wurden in Sterilwerkbänken mit laminarem Luftstrom (Heraeus HeraSafe) durchgeführt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden nur sterile Zellkulturmaterialien aus Polystyrol (Nunc, Greiner), sterile Lösungen sowie autoklavierte Pipetten verwendet. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Heraeus BDD 6220 Begasungsbrutschrank bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 5% CO₂-Begasung. Die verwendeten Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium mit Phenolrot kultiviert, dem zusätzlich 1/10 fetales Kälberserum (FCS), 1/100 L-Glutamin (v/v) und 1/100 Penicillin/Streptomycin (v/v) zugesetzt war.

3.3.2 Passagieren von Zellen

Zur Vermeidung eines Wachstumarrest aufgrund von Kontaktinhibition wurden die Zellen, abhängig von ihrer Wachstumdichte, alle 2-7 Tage zwischen 1:3 und 1:20 verdünnt und neu ausplattiert. Hierzu wurde zunächst das Medium abgenommen und

der Zellrasen mit sterilem PBS gewaschen, um Serumreste und Proteasen zu entfernen. Durch Behandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen, nach fünfminütiger Inkubation bei 37°C, von der Kulturschale gelöst. Dieser Prozess wurde durch leichtes Aufklopfen der Schalen unterstützt. Die abgelösten Zellen wurden in frischem, 37°C warmen Medium resuspendiert und auf neue Kulturschalen passagiert.

3.3.3 Einfrieren von Zellen

Zunächst wurden die Zellen wie beschrieben abgelöst, in 10 ml Medium aufgenommen und in ein 15 ml Falconröhrchen überführt. Dieses wurde 5 min bei 13.000 rpm (Minifuge) zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in eiskaltem DMEM-Medium mit ¼ FCS (v/v) und 1/10 DMSO (v/v) (3ml auf 10⁷ Zellen) aufgenommen, sofort auf vorgekühlte 1,8 ml Gefrieröhrchen (Nalgene) verteilt und in einer Styroporbox bei -80°C eingefroren. Damit wird versucht, die Temperatur langsamer absinken zu lassen, um eine mögliche Eiskristallbildung, welche die Zellen irreversibel schädigt, zu vermeiden. Nach sieben Tagen wurden die Zellen zur längerfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.3.4 Auftauen von Zellen

In Gefrieröhrchen eingefrorene Zellen wurden im 37°C warmen Wasserbad abgetaut und sofort in 10 ml vorgewärmtem Medium suspendiert. Dieser Arbeitsschritt wurde schnellst-möglich durchgeführt, um Zellschädigungen während des Auftauens zu vermeiden. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 2.000 rpm (Minifuge) zentrifugiert und das Zellepellet in frischem Medium aufgenommen, um das vorhandene DMSO zu entfernen. Am nächsten Tag wurde nach Kontrolle der Zelladhäsion das Medium gewechselt.

3.3.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zählung wurde in einer modifizierten Neubauer-Zählkammer vorgenommen. Frisch trypsinisierte, möglichst gleichmässig in einem definierten Volumen Medium suspendierte Zellen wurden unter das Deckglas pipettiert. Anschliessend wurde die Zellzahl fünfmal in den 16 Grossquadraten bestimmt. Durch Multiplikation des Mittelwertes mit dem Faktor 10 000 erhielt man die Zahl der Zellen pro Milliliter.

3.3.6 Transiente Transfektion nach der Kalziumphosphat-Methode

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Bildung eines DNS-Kalziumphosphat-Präzipitats, welches sich auf der Oberfläche der Zellen ablagert und von diesen endozytotisch aufgenommen wird (Wigler et. Al, 1978). Die DNS wurde zunächst mit einer 2 M CaCl₂-Lösung gemischt, mit Aqua dest. auf ein entsprechendes Volumen eingestellt und die Präzipitatbildung durch langsames zugeben von 2x HBS-Puffer unter Einsatz eines Vortex-Schüttlers eingeleitet. Der Transfektionsansatz wurde auf 80% konfluente Zellen aufgetropft, die 24 h zuvor auf die Gewebekulturschalen ausplattiert und vier Stunden vor Transfektion mit frischem Medium versorgt worden waren. Nach 12 h bzw. 16 h wurden die Präzipitate durch Waschen mit PBS entfernt und neues Medium zugesetzt.

3.3.7 Retrovirale Infektion von Säugerzellen

Zur stabilen Integration von Plasmid-DNS in das Genom von Nagerzellen wurde die Technik des retroviralen Gentransfers (Pears et al., 1993) angewandt. Als Vektoren dienten Plasmide der pBabe-Gruppe (Morgentstern et al., 1990), in welche die entsprechende DNS kloniert wurde. Die Plasmide wurden, wie beschrieben, in Bakterien amplifiziert und in präparativem Massstab isoliert und aufgereinigt. Auf 15 cm Kulturschalen wurden $1,5 \times 10^7$ Zellen der Packaging-Zelllinie Phoenix plattiert und am darauf folgenden Tag nach Erreichen von ca. 80% Konfluenz mit 60 µg DNS nach der beschriebenen Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Nach zwölf Stunden wurde das Medium gewechselt. Weitere zwölf Stunden später wurde das die Viren enthaltende Medium abgenommen und zweimal bei 1.200 rpm (Megafuge) für fünf Minuten zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Der Virusüberstand wurde entweder sofort zur Infektion von Zellen verwendet oder bei -80°C gelagert. Nach 48 Stunden konnte neu aufgebrachtes Medium in gleicher Weise als Überstand geerntet werden. Zur anschliessenden Infektion wurden 2 bis 5×10^5 Zellen auf 15 cm Schalen plattiert. Am folgenden Tag wurden 6 ml des Überstandes mit 3 ml Medium (15% FCS) präpariert und zusätzlich 4 µg Polybren (Hexadimethrinbromid) pro Mililiter Virusüberstand hinzugefügt, um die Infektionsrate zu erhöhen. Alle drei Stunden wurden je 3 ml auf die Zellen aufgebracht. Nach neun Stunden wurden zusätzlich 5 ml frisches Medium zugegeben. 48 Stunden nach Infektion wurden die Zellen 1 zu 5 gesplittet und in entsprechendes Selektionsmedium überführt. Im Weiteren wurden Zellpools Wachstumskurven, Zellsortierung, BrdU-Immunfluoreszenz, Zellalterungs-Assay oder Expressions-Analyse generiert.

3.3.8 Erstellen einer Wachstumskurve

Unter Verwendung der zuvor beschriebenen Methoden wurde ein Wachstumsvergleich einer normierten Menge von Zellen verschiedener Zellpools erstellt. Dazu wurden retroviral infizierte, Myc-exprimierende Zellen nach gleichlanger Kultivierung beginnend mit 20.000 Zellen auf 6 cm Schalen ausplattiert. Dabei wurden neun mal jeweils drei Schalen pro Pool erstellt. Um die Plattierung zu kontrollieren und eine Standardisierung der Auszählung zu ermöglichen, wurde am Tag 0 mit der Bestimmung der Zellzahl, wie beschrieben, begonnen. Diese wurde bis zum Tag 8 fortgeführt. Am vierten Tag wurde für die Schalen „Tag 6“ und folgende ein Umsetzen auf 10 cm Schalen zur Vermeidung von Kontaktinhibition vorgenommen. Aus den jeweils drei ermittelten Zellzahlen pro Pool und Tag wurde der Mittelwert gebildet und in einer logarithmischer Skalierung aufgetragen.

3.3.9 Fluoreszenzaktiviertes Sortieren (Durchflusszytometrie)

Mit Hilfe des Fluoreszenz-aktivierten Zellsorters ist es möglich spezielle Zellen in einer Zellsuspension in vitalem Zustand zu isolieren, anzureichern und funktionell zu analysieren. Voraussetzung für das Sortieren ist eine spezifische Färbung mit der die Zellen differenziert werden können. Das Prinzip der Methode besteht darin, in Suspension befindliche Zellen durch Druckluft in eine Durchflusskammer zu transportieren, um von dort, durch eine Düse gepresst, in einen Tropfenstrom überzugehen. Dieser Tropfenstrom wird durch Vibration mittels einer piezoelektrischen Transducers erzeugt und stabilisiert. Jeder Tropfen passiert einen seitlich einfallenden Laserstrahl, der eine Analyse aller Einzelzellen vornimmt. Im hier beschriebenen Fall wurde das Verfahren zur Bestimmung der Phase des Zellzyklus genutzt. Als Färbelösung wurde die DNS interkalierende Substanz Propidiumiodid verwendet. Bei 488 nm Anregung zeigt der DNS-Propidiumiodid-Komplex eine maximale Emission bei etwa 615 nm und kann im Fluoreszenz-aktivierten Zellsorter gemessen werden. Da das Verhältnis DNS-Gehalt pro Zelle proportional zum Verhältnis Propidiumiodid pro Zelle ist, können die Zellen nach dem Gehalt der DNS geordnet werden.

Dazu wurden die Zellen per Trypsinisierung geerntet, in 10 ml Medium aufgenommen und fünf Minuten bei 1.000 rpm (Minifuge) zentrifugiert. Nach einem PBS-Waschschritt und erneuter fünfminütiger Zentrifugation bei 1.000 rpm (Minifuge)

wurden die Zellen in 200 µl PBS aufgenommen und mit 800 µl eiskaltem Ethanol (100%) fixiert. Die Zellen wurden über Nacht bei -20°C gelagert. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 1.000 rpm (Minifuge) zentrifugiert, mit PBS gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl PBS resuspendiert, mit 15 µl Propidiumiodid (1 mg/ml) und 10 µl RNase (25 mg/ml) versetzt und eine Stunde auf Eis und in Dunkelheit inkubiert. Es folgte die Analyse im Zellsorter (FACScalibur) und die Auswertung der Daten unter Verwendung des Programms Modifit® (Verity Software House).

3.3.10 Messung der Zellalterung

Säugerzellen in Kultur zeigen eine limitierte Zahl von Zellteilungen. Sie verbleiben anschliessend in einem Status, der als replikative Seneszenz bezeichnet wird. Hauptmerkmale seneszenten Zellen ist die vergösserte, flache Morphologie, die Zunahme der Aktivität des Enzyms saure β-Galaktosidase und die Akkumulaiton einer Vielzahl von Proteinen der Zellzyklus-Inhibition. Die Aktivität der β-Galaktosidase wurde bestehendem Protokoll (Dimri et al., 1995) folgend nach geringer Modifikation gemessen. Die zu untersuchenden Zellen wurden zweimal mit PBS pH 7,2 gewaschen, anschliessend mit 0,5% Glutaraldehyd für fünf Minuten fixiert und wieder zehn Minuten mit 1 mM MgCl₂ in PBS pH 7,2 gewaschen. Die Zellen wurden mit X-Gal-Lösung gefärbt, die das Substrat für die β-Galaktosidase (1 mg/ml) liefert. Nach ein bis zwei Tagen Inkubation bei 37°C stellt sich, je nach Alterung der Zelle, eine Blaufärbung ein. Der Anteil gefärbter Zellen wurde in randomisiert gewählten Gesichtsfeldern, wie oben beschrieben, ausgezählt.

3.3.11 DNS-Immunfluoreszenz

Um die Teilungsaktivität von retroviral infizierten, Myc-exprimierenden Zellen darzustellen, wurde die Methode der Bromodeoxyuridin(BrdU)-Immunfluoreszenz gewählt. Dabei wird den proliferierenden Zellen das Thymidin-Analogon Bromodeoxyuridin zum Einbau in die zu synthetisierende DNS angeboten. Das inkorporierte BrdU kann später mit einem Antikörper markiert und in der Immunfluoreszenz dargestellt werden. So kann die Rate der Zellen ermittelt werden, die sich während der Inkorporation in der Synthesephase befanden. Zunächst wurden ca. 10.000 Zellen pro 6 cm Schale nach Einlage von mikroskopischen Deckgläschen ausgesät und über 48 h in Medium mit 10% bzw. 0,1% FCS kultiviert. Nach den ersten

24 h wurde ein Mediumwechsel vollzogen. Eine Stunde vor dem Fixieren wurde eine BrdU-Lösung in der Konzentration 100µg/ml zugesetzt. 60 min später wurden die Zellen zweimal mit PBS pH 7,4 gewaschen und in 3,7% Paraformaldehyd für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach zweimaliger Inkubation in 0,1 M Glycin (5 min) und 0,1% (v/v) NP-40 (10 min), beide gelöst in PBS pH 7,4, wurden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur in IF-Blocklösung (0,1% (v/v) NP-40, 5% (v/v) FCS in PBS pH 7,4) behandelt, um die unspezifische Antikörperbindung zu minimieren. Anschliessend wurden die Zellen 60 min in IF-Blocklösung, die den gegen das BrdU gerichteten Antikörper in der Verdünnung 1 zu 3 enthielt, inkubiert. Zur Gegenfärbung bzw. zur Darstellung der Zellkerne wurde DAPI-Stocklösung (5 mg/ml) verwendet. Die mikroskopischen Deckgläschen wurden dreimal für 5 min mit 0,1% (v/v) NP-40 in PBS pH 7,4 und einmal mit PBS pH 7,4 gewaschen und dann unter Verwendung von Einsiegelungsmedium (Mounting Medium) auf Objektträgern fixiert. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop anhand randomisiert ausgewählter Gesichtsfelder. Dabei wurde der Anteil von BrdU-markierter DNS an allen Zellkernen quantifiziert.

4 Ergebnisse

Die Bindung von Myc unterdrückt die Transaktivierung durch Miz-1 (Peukert et al., 1997). Um diesen Prozess weiter zu charakterisieren, versuchte man eine Punktmutation im genetischen Kode des Myc-Proteins zu generieren, die als Auswirkung selektiv die Interaktion von Myc mit Miz-1 blockiert, aber weiterhin die Bindung von Myc an Max, und damit die Transaktivierung, zulässt. Vorhergehende Deletions-Analysen ordneten die Seite der Interaktion von Myc der Helix-Loop-Helix Domäne zu (Peukert et al., 1997). Zur Erzeugung einer entsprechenden Punktmutante wurde das cDNS-Fragment, welches für den Carboxy-Terminus des Myc-Proteins codiert, willkürlich mutiert. Dazu verwendete man ein auf der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) basierendes Protokoll (Beuger 2000). Die entstandenen, mutierten Klone wurden auf die Interaktion mit Miz-1 beziehungsweise Max anhand eines Two-Hybrid-Essays in Hefe-Zellen getestet (nach Vidal et al., 1996). Unter anderem zeigten zwei der Klone die gesuchte, fehlende Interaktion mit Miz-1 bei erhaltener Bindungsfähigkeit an Max. Es handelt sich dabei um den Austausch der Aminosäure Nummer 394 von Valin zu Asparaginsäure bzw. Nummer 405 von Serin zu Phenylalanin. Dem entsprechend werden diese zwei Mutanten im Folgenden als V394D bzw. S405F bezeichnet.

Valin 394 und Serin 405 sind in der Evolution hoch-konservierte Bereiche des Myc-Proteins der äußeren Oberfläche an Helix II, wobei sich Serin 405 auch als konservierter Bereich in N-Myc, nicht aber in L-Myc findet. In den Partner-Proteinen Max und Mad stellen sie hingegen keine konservierten Bereiche dar.

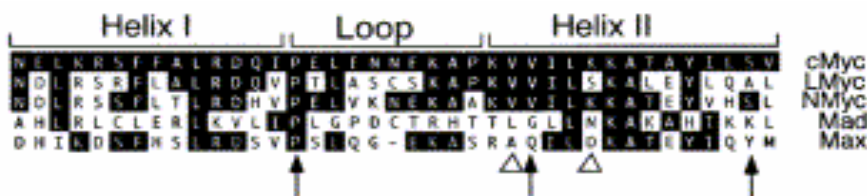


Abbildung 4.1: Anordnung der HLH-Domäne der humanen c-Myc, N-Myc, L-Myc, Max und Mad-1-Proteine. Darstellung der isolierten Punktmutationen. Die Dreiecke markieren die Stellen der designten Mutationen (Herold et al., 2002).

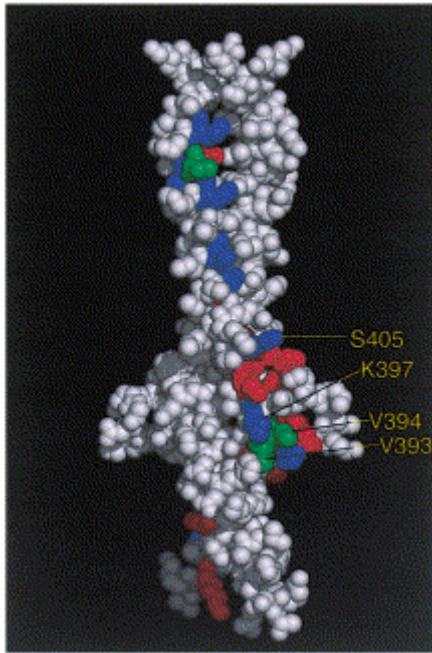


Abbildung 4.2: Kristallstruktur des Max-Homodimers (aus Herold et al., 2002). Konservierung der Myc/Miz-1 Schnittstelle im Laufe der Evolution. Die farblich markierten Polypeptidketten und zeigen die Anzahl der differenten Aminosäuren, welche sich auf der homologen Position des Myc-Proteins finden. Grün markiert: eine differente Aminosäure; blau zwei differente Aminosäuren. Rot dargestellt sind die Aminosäuren, die im Myc-, Max- und/oder Mad-Protein konserviert sind.

Um zu zeigen, ob die Mutanten die verlangten transkriptionalen Fähigkeiten noch innehaben, wurden transiente Transfektions-Essays zur Untersuchung der Inhibierung der transkriptionalen Aktivierung durch Miz-1 angefertigt. Alle Mutanten zeigten eine Beeinträchtigung in ihrer Fähigkeit die Miz-1-vermittelte Transkription der Reporter-Plasmide für p15ink4b und den Adenovirus major late (AdML) zu reprimieren (Beuger 2000). Das deutlichste Ergebnis lieferte dabei die V394D-Mutante (MycV394D). Sie war nicht in der Lage die Miz-1-bedingte Transkription zu unterdrücken. Koimmuno-Präzipitationen mit transient-transfizierten HeLa-Zellen bestätigten, dass MycV394D nicht mit Miz-1 in Säugerzellen interagiert, selbst wenn es in hohen Konzentrationen überexpressiert wurde (Beuger 2004).

Im Gegensatz dazu waren die Mutanten gleichsam effektiv wie die Wild-typ Variante des Myc-Gens (Mycwt), E-Box-abhängige Reporter des alpha-Prothymosin-Gens zu aktivieren.

Da die fehlende Repression sich an dem V394D-Allel am deutlichsten aufzeigen liess, konzentriert sich die folgende Arbeit besonders auf die weitere Analyse dieser Variante.

4.1. Biologie der Miz-1-bindungsdefizienten Myc-Mutanten im Zellsystem

Um zu bestätigen, dass MycV394D neben der biochemischen weiterhin auch biologische Funktionalität besitzt, wurde auf die Fähigkeit von Myc Wachstum und programmierten Zelltod in etablierten Zellen zu stimulieren getestet (Eilers et al., 1991; Evan et al., 1992). Beide Effekte benötigen die Bindung von Myc an Max als Voraussetzung für die Aktivierung der Transkription durch Myc.

4.1.1 Subklonieren der Mutanten in pBabe-Vektoren

Zur Durchführung der Experimente mussten die erzeugten Mutationen zuerst in entsprechende Vektoren kloniert werden. Hierzu wurden solche gewählt, die eine Expression der Information in einem Retrovirus für murine Säugerzellen ermöglichen. Die Produktion von Retroviren erfolgte mit Hilfe von Phoenix-Zellen (Verpackungszelllinie), die nach Transfektion mit den entsprechenden Vektoren und adäquater Inkubation Viren zur Infektion muriner Säugerzellen freisetzen. Die Viren beinhalten die genetische Information aus dem Vektor versehen mit einem entsprechenden Promotor zur Überexpression. Zusätzlich enthalten sie auch einen Resistenzmarker, der eine spätere Selektion zur ausschließlichen Kultivierung infizierter Zellen ermöglicht.

4.1.2 Die Mutationen MycV394D und MycS405F zeigen keinen signifikanten Wachstumsunterschied im Vergleich mit Mycwt

Es wurden die von Mateyak (Mateyak et al., 1997) beschriebenen Rat1c-myc^{-/-}-Zellen verwandt. Der c-myc-null-Phänotyp verhält sich in seiner Form als Zelllinie stabil. Das ursprüngliche Wachstumsverhalten lässt sich durch transgene Expression wiederherstellen. Exponentiell wachsende c-myc-defiziente Zellen besitzen die gleiche Zellgrösse wie ihre c-myc^{+/+}-Vorläuferzellen. Sowohl die G1- als auch die G2-Phase des Zellzyklus sind signifikant verlängert, der Eintritt in die S-Phase ist verspätet, die Dauer der S-Phase bleibt unbeeinflusst. Diese c-myc-defizienten Zellen wurden wie zuvor beschrieben mit pBabeHygro-Plasmiden die wahlweise Mycwt, MycV394D, MycS405F oder zur Kontrolle einen leeren Vektor enthielten infiziert. Eine erste

Versuchsreihe unter Einsatz des pBabePuro-Vektor scheiterte, da die Rat1c-myc^{-/-} - Zellen eine Resistenz gegen Puromycin, wahrscheinlich im Rahmen ihrer Knockout-Erzeugung, erworben hatten (persönliche Mitteilung von John Sedivy). Unter Verwendung des pBabeHygro-Vektors überexprimierten sie in der Folge das eingebrachte Gen. Dieses wurde anhand von Westernblots geprüft. Anschließend wurde eine definierte Anzahl von Zellen ausplattiert um eine Reihe zur Auszählung über acht Tage zu ermöglichen. Zum weiteren Vergleich wurde eine Reihe mit Rat1Wildtyp-Zellen eingebracht, die zuvor ebenfalls mit dem Kontroll-Vektor stabil infiziert worden waren.

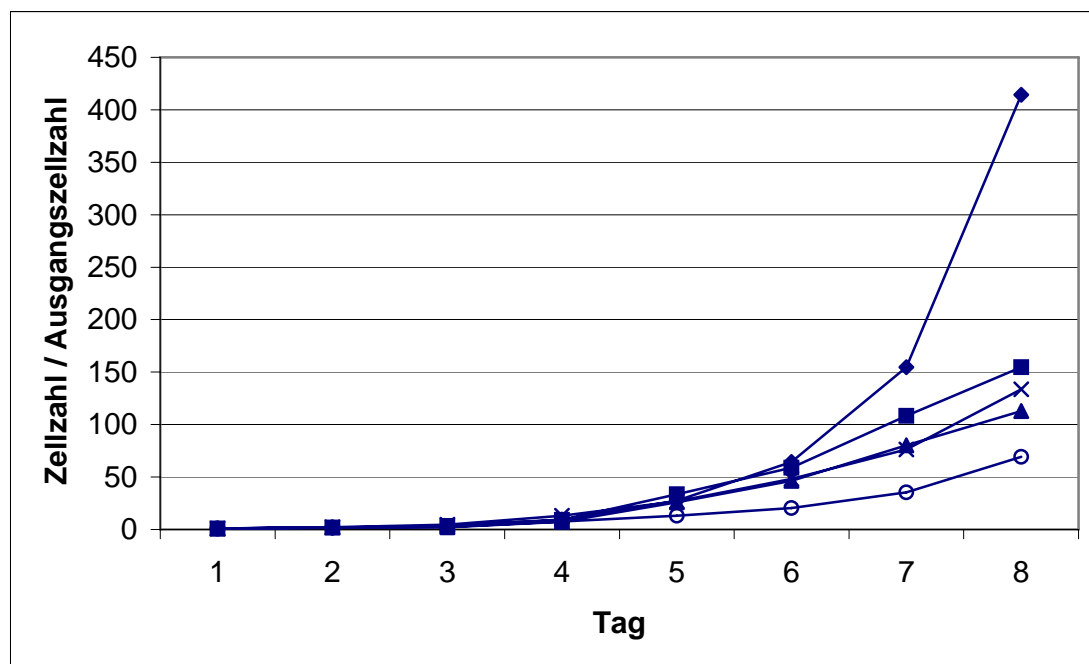


Abbildung 4.3: Wachstumskurve für Rat1c-myc^{-/-}-Zellen in relativer Auftragung. Rat1c-myc^{-/-}-Zellen wurden mit den Allelen leerer Vektor (Kreis), Mycwt (Quadrat), MycV394D (Dreieck) und MycS405F (Kreuz) infiziert und selektioniert. Daraufhin wurde mit einer definierten Anzahl von Zellen eine Wachstumskurve über acht Tage erstellt. Zum Vergleich das Wachstum einer Reihe mit Rat1Wildtyp-Zellen (Karo) im gleichen Zeitraum.

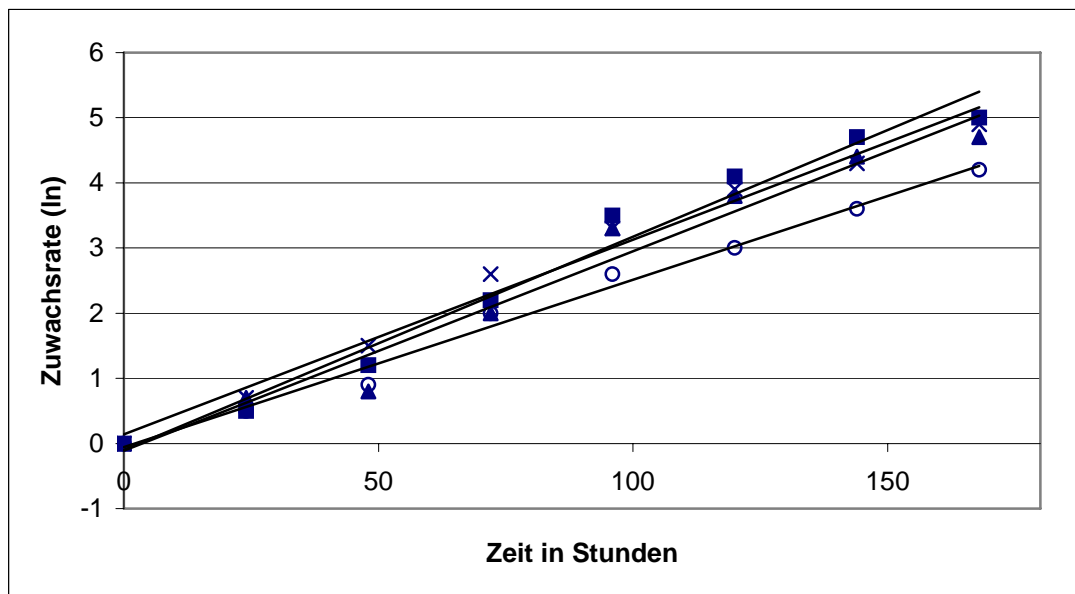


Abbildung 4.4: Verdopplungsrate in logarhythmischer Auftragung. Rat1c-myc-/- Zellen stabil infiziert mit leerem Vektor (Kreis), Mycwt (Quadrat), MycV394D (Dreieck), MycS405F (Kreuz) und selektioniert.

Es zeigt sich, dass gegenüber der Expression des leeren Vektors ein relativer Rescue-Effekt, das heißt ein annähern an das Wachstumsverhalten der Wildtyp-Form, bezüglich der mit Mycwt, MycV394D und MycS405F stabil infizierten Zellen zu beobachten ist. Innerhalb dieser Gruppe besteht jedoch kein signifikanter Wachstumsunterschied. Dies wird besonders in der Betrachtung der Verdopplungsrate in logarithmischer Auftragung deutlich. Die Steigung der Ausgleichgeraden liegt für diese Gruppe in der Größenordnung bis 0,033. Für die Kontrolle dagegen bei 0,026.

Ein weiterer Unterschied ist auch im Bezug auf die Rat1-Wildtyp-Zellen nach Infektion mit dem Kontroll-Vektor zu beobachten. Hier relativiert sich der Rescue-Effekt bezüglich einer Myc-Überexpression nach retroviraler Infektion.

4.1.3 In Rat1-Zellen stimulieren Mycwt, MycV394D und MyS405F den Eintritt in die S- und G2-Phase

Zur biologischen Funktion des Myc-Proteins zählt unter anderem die Induktion der S-Phase und der Apoptose. Zur Differenzierung dieser Effekte dient der Vergleich unter Hochserum- (10% FCS) und Niedrigserum-Bedingungen (0,1% FCS). Hierzu wurden Rat1-Wildtypzellen mit den oben genannten Viren stabil infiziert. Verglichen wurden

eine Kontrolle mit leerem pBabePuro-Vektor, das Mycwt-, das MycV394D- und das MycS405F-Allel. Die stabil infizierten Kulturen wurden für 48 Stunden unter jeweiligen Serum-Bedingungen kultiviert. Die Expression wurde mittels Westernblot kontrolliert. Nach Fixierung und Färbung mit Propidiumiodid wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Die quantitative Auswertung zeigte, dass jedes Allel die Anzahl der Zellen in der G1-Phase vermindert, den Teil der Zellen in der S- und G2-Phase jedoch vergrößert. Diese Effekte konnten sowohl unter 10% als auch unter 0,1% FCS beobachtet werden. Keine Unterschiede zeigten sich in der Fähigkeit unter 0,1% FCS-Bedingungen Apoptose zu induzieren. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass sowohl MycV394D als auch MycS405F die Fähigkeit der E-Box-abhängigen Aktivierung bzw. Gen-Expression beibehalten haben und weiterhin Wachstum und programmierten Zelltod in Rat1-Zellen auslösen können.

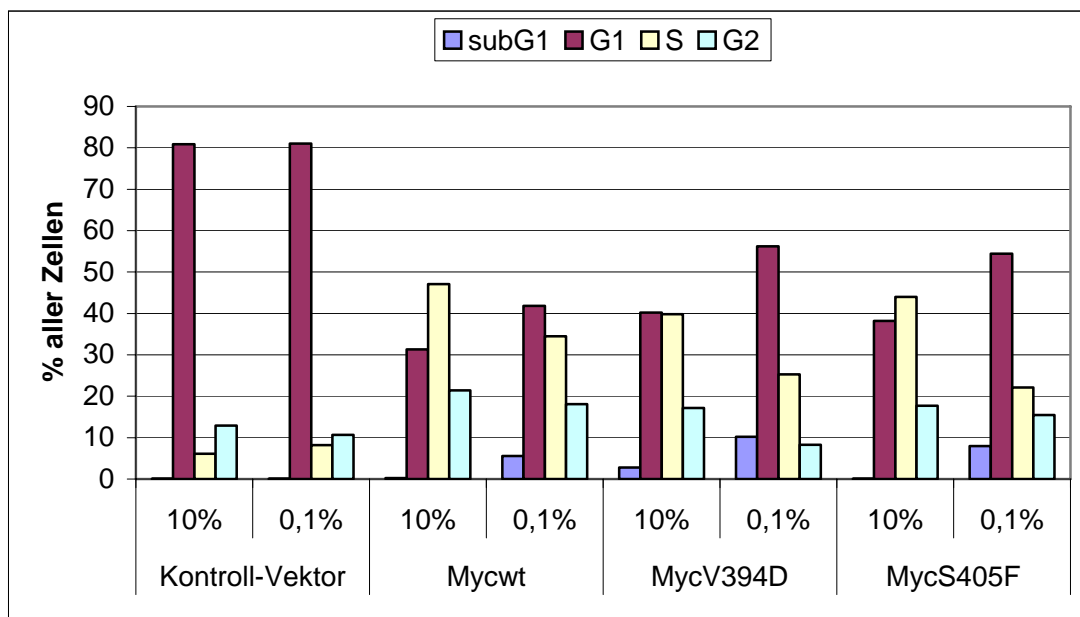


Abbildung 4.5: MycV394D und MycS405F können S-Phase und Apoptose induzieren. Rat1Wildtyp-Zellen wurden mit den oben genannten Konstrukten infiziert und selektioniert. Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden mit 10% oder 0,1% FCS behandelt und im Zellsorter analysiert.

Um die Effekte bezüglich der Apoptose-Induktion noch deutlicher herauszustellen wurde das Experiment unter ähnlichen Bedingungen unter Hinzunahme einer Reihe mit konfluent-gewachsenen Zellen wiederholt.

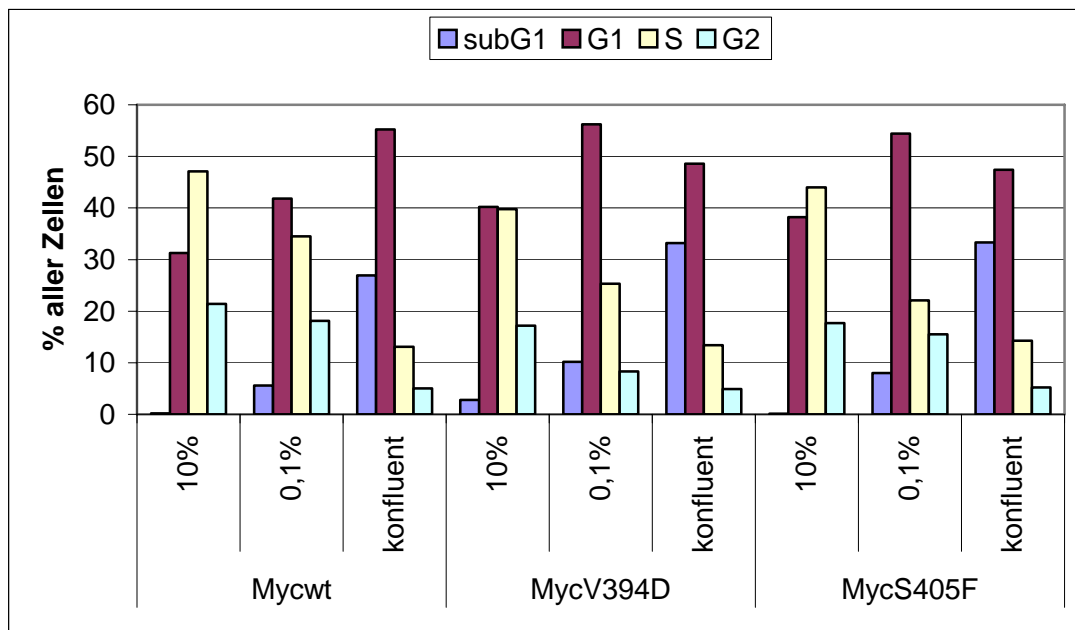


Abbildung 4.6: Zunahme der Apoptoserate unter konfluenten Bedingungen. . Rat1wt-Zellen wurden mit den oben genannten Konstrukten infiziert und selektioniert. Zusätzlich wurde eine Reihe mit konfluent-bewachsenen Platten eingefügt. Anschliessend wurden die Zellen für 48 Stunden mit 10% FCS, 0,1% FCS bzw. 0,1% FCS (konfluente Reihe) behandelt und im Zellsorter analysiert.

Hier zeigte sich nochmals, dass die Fähigkeit zur Induktion des programmierten Zelltods für die Mutanten MycV394D und MycS405F in gleichem Masse zutrifft, wie für Mycwt.

4.1.4 In der BrdU-Markierung zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Mycwt, MycV394D und MycS405F

Zur Bestimmung der Teilungsaktivität unter Einfluss der Myc-Überexpression wurde den Zellen das Thymidin-Analogon Bromodeoxyuridin (BrdU) zum Einbau in die zu synthetisierende DNS angeboten. Das inkorporierte BrdU konnte später mit einem Antikörper markiert und in der Immunfluoreszenz dargestellt werden. So lies sich die Rate der Zellen ermitteln, die sich während der Inkorporation in der Synthesephase befunden haben.

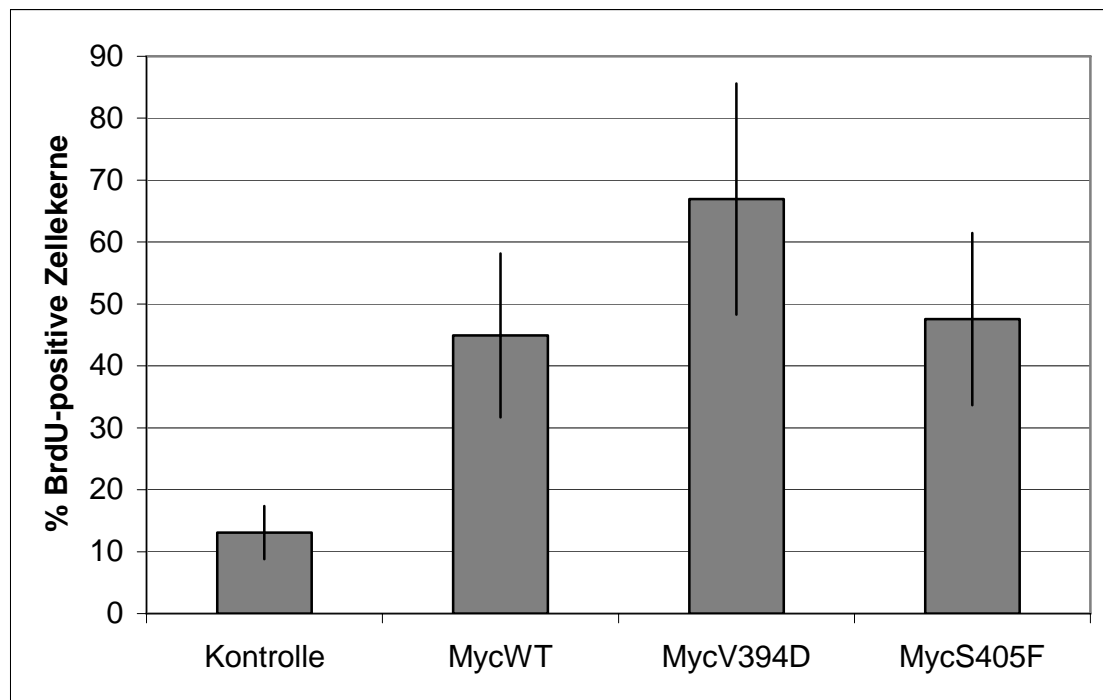


Abbildung 4.7: Bestimmung der Teilungsaktivität stabil infizierter Rat1 Wildtyp-Zellen. Rat1 Wildtyp-Zellen wurden mit den oben genannten Konstrukten infiziert, selektioniert und 48 Stunden in 10% FCS kultiviert (Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung aus separaten Auszählungen).

Die Gruppe, welche die Mutationen überexprimiert, zeigt eine deutlich höhere Inkorporationsrate, was sich als erhöhte Teilungsaktivität interpretieren lässt. Die Unterschiede innerhalb der Gruppe sind nicht signifikant (siehe Standardabweichung).

Fazit: In den Experimenten konnte Mycwt zwar am Rande deutlichere Effekte bezüglich der Zell-Proliferation erzielen (siehe FACS), trotzdem fand sich kein signifikanter Unterschied in der BrdU-Markierung.

4.1.5 Im Seneszenz-Assay kann MycV394D nicht länger die Zellalterung verzögern

Der Gebrauch von primären Maus-Embryo-Fibroblasten (Mef) zur weiteren Analyse ergab sich aus der klar definierten Genetik dieser Zellen. In diesen Zellen wird p53 als Antwort auf die Myc-Expression über die Induktion von p19ARF stabilisiert (Zindy et al., 1998). Überraschenderweise erleichtert Myc die Immortalisierung von Maus-Embryo-Fibroblasten, was nahelegt, dass Myc mit der p53-Signalübertragung in einer p19ARF- homozygoten Situation interferieren kann. Ob und welche Rolle die Interaktion von Myc und Miz-1 in der Suppression der Zellalterung (Seneszenz) spielt sollte also im Folgenden geklärt werden. Embryonale Fibroblasten in Kultur zeigen eine

limitierte Zahl von Zellteilungen. Sie verbleiben anschließend in einem Status, der als replikative Seneszenz bezeichnet wird. Hauptmerkmale seneszenten Zellen ist die vergrößerte, flache Morphologie und unter anderem die Zunahme der Aktivität des Enzyms saure β -Galaktosidase, ein zu den Glykosidasen gehörendes Enzym, das galaktoside Bindungen spaltet (Dimri et al., 1995).

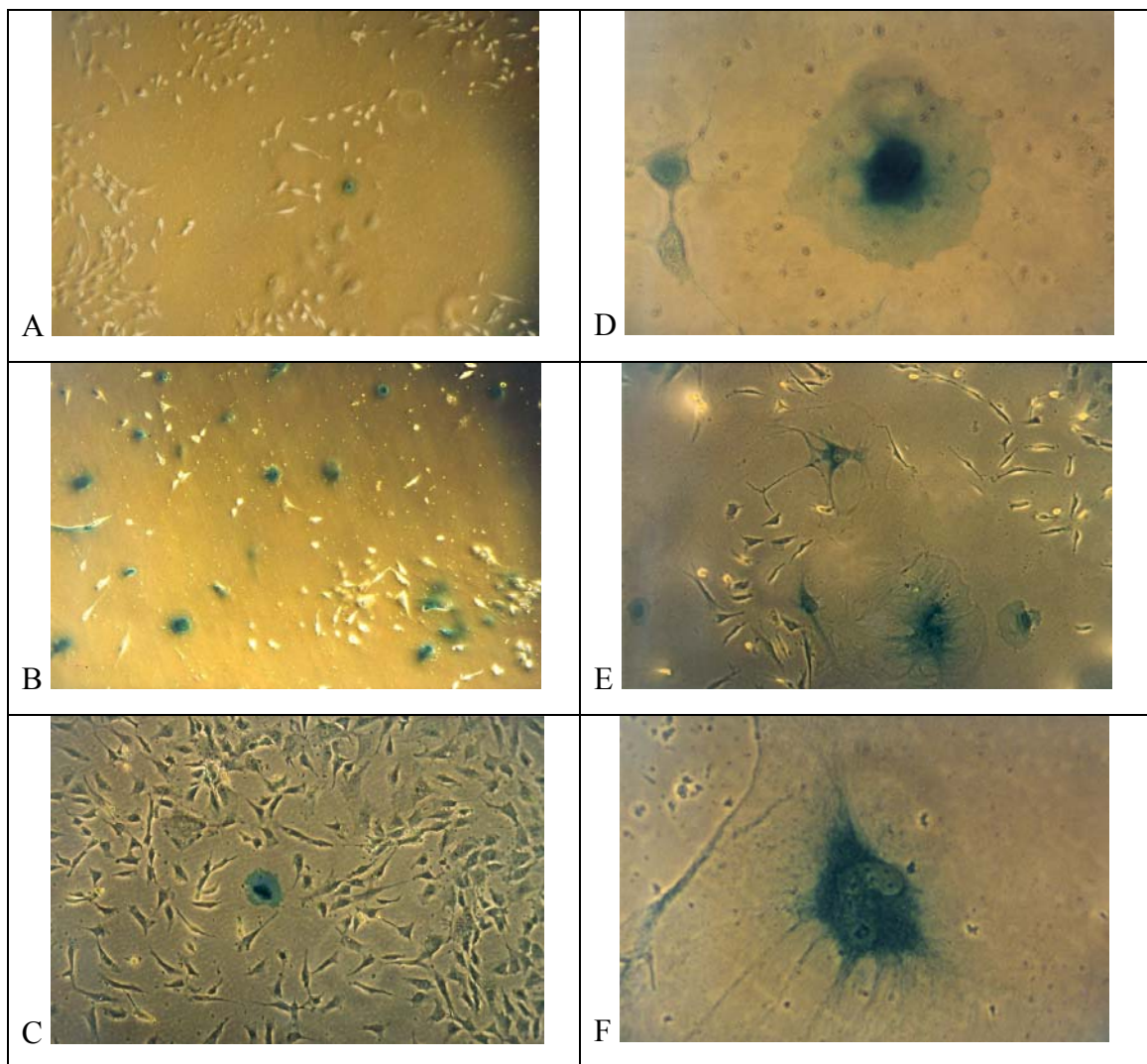


Abbildung 4.8: Bilder A bis F: p53-heterozygote Mausembryofibroblasten wurden mit retroviralen Virusüberständen, die den leeren Vektor zur Kontrolle, Mycwt (A), MycV394D (B) oder MycS405F (C) enthielten stabil infiziert. Nach Selektion, Fixation und Färbung nach Protokoll zeigen sich Änderungen im Alterungsverhalten sowie in der Morphologie (D, E, F) der Zellen.

Maus-Embryo-Fibroblasten, die heterozygot für p53 sind (Mefp53^{+/-}), wurden mit retroviralen Virusüberständen stabil infiziert, die wahlweise einen leeren Vektor zur Kontrolle, Mycwt, MycV394D oder MycS405F enthielten. Die Expression wurde mittels Westernblot kontrolliert. Nach einmaligem Splitten der Zellen bei 60%iger Konfluenz in der Kultur wurde eine Seneszenz-Assay, nach 24 beziehungsweise 48 Stunden zur Bestimmung der β -Galaktosidase-positiven Zellen durchgeführt.

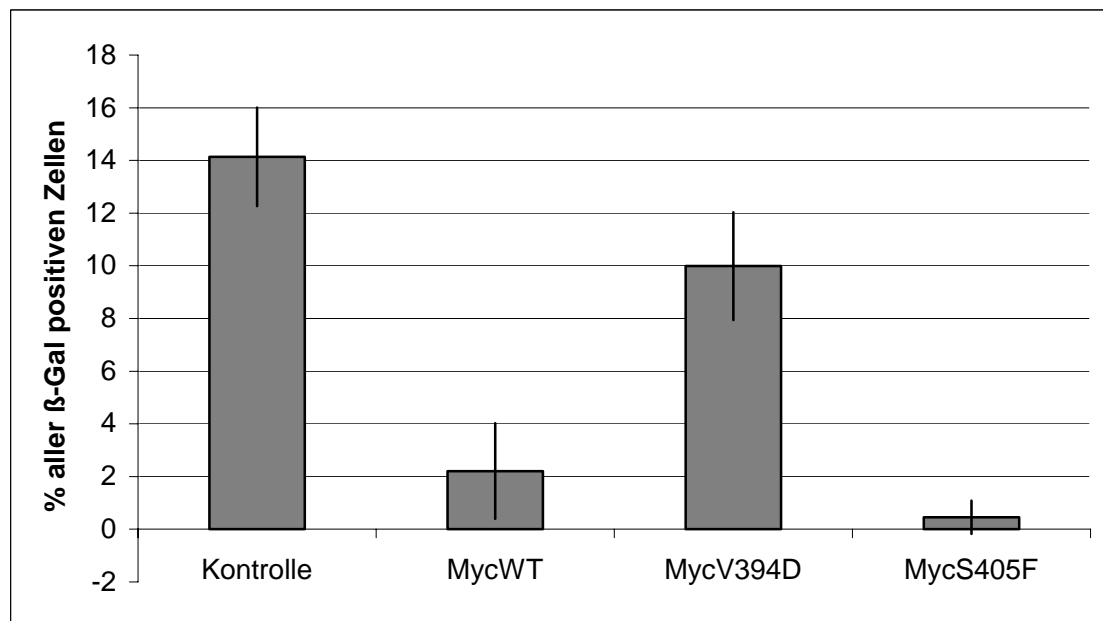


Abbildung 4.9: Nach 24 Stunden zeigt sich ein Defizit von MycV394D in der Immortalisierung embryonaler Fibroblasten. Mefp53^{+/-}-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten infiziert und mit Hygromycin selektioniert. Nach oben genannter Kultivierung wurden die Zellen fixiert, entsprechend dem Protokoll gefärbt und gezählt (Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung aus separaten Auszählungen).

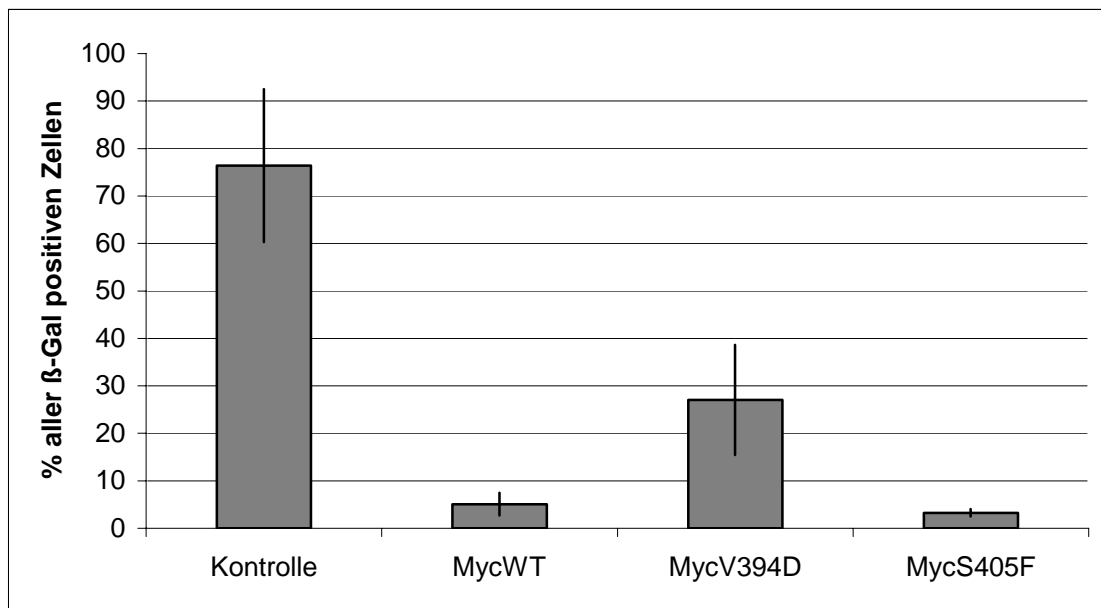


Abbildung 4.10: Nach 48 Stunden kommt es zunehmend zu einer Myc-unabhängigen Immortalisierung auch der MycV394D-enthaltenden Fibroblasten. Der Unterschied im Verhältnis zu Mycwt und MycS405F bleibt jedoch deutlich. . Mefp53^{+/-}-Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten infiziert und mit Hygromycin selektioniert. Nach oben genannter Kultivierung wurden die Zellen fixiert, entsprechend dem Protokoll gefärbt und gezählt (Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung aus separaten Auszählungen).

Übereinstimmend mit der Rolle der Myc/Miz-1-Interaktion in der Suppression der Zellalterung, verminderte die Infektion sowohl mit Mycwt als auch mit MycS405F den Anteil seneszenten Zellen. MycV394D aber konnte die Zellalterung nicht in gleichem Masse verzögern. Die diesbezügliche Differenz konnte nicht mit einer unterschiedlichen Induktion von p19ARF oder p53 erklärt werden, die in Reaktion auf Mycwt und MycV394D aufgetreten wäre.

4.2 Die Microarray-Analyse beschreibt Unterschiede in der Genregulation auf RNS-Ebene zwischen Mycwt und MycV394D

Mit dem Ziel neue Gene zu beschreiben, die in Abhängigkeit von der Myc-Miz-1-Interaktion reguliert werden, wurden die im obigen Experiment beschriebenen Zellen einer Oligo-Microarray-Analyse unterzogen. Aus den noch vorhandenen, weiter in Kultur gehaltenen Maus-Embryo-Fibroblasten wurden zeitnah die mit Mycwt und MycV394D infizierten Populationen gewählt. Aus einer ausreichend großen Menge von

Zellen wurde mit Hilfe eines industriellen Baukasten-Systems die RNS dieser Zellen isoliert und aufgereinigt. Die Stabilität und der Gütegrad der isolierten mRNA wurden anhand eines Gels geprüft. Die Herstellung einer doppelsträngigen cDNA, der Einbau biotinylierter Nukleotide und die *in vitro* cRNA-Synthese erfolgten in Zusammenarbeit mit Ludger Kleinhitpass vom Institut für Zellbiologie (Essen). Die Microarray-Analyse auf einem Affymetrix® MGU74Av2-Chip wurde im Anschluss hieran durchgeführt.

Als zu beurteilendes Maß galt dabei die relative Zu- oder Abnahme im Expressionslevel zwischen den experimentellen und den zum Vergleich vorliegenden (Baseline) Zielgenen. Zur Bewertung des Gütegrads einer Veränderung wurden komplexe mathematische Rechnungen verwandt, die nicht nur das absolute und relative Maß der Zu- oder Abnahme, sondern auch Größen zur Beschreibung der Hybridisierungsintensität einschlossen. Detaillierte Informationen sind nachzulesen im *Affymetrix® Microarray Suite User's Guide*.

Zusammenfassend fand sich im Vergleich der mRNA-Profile zwischen MycV394D-überexprimierenden Zellen und Mycwt-überexprimierenden Zellen eine Reihe von Genen, die herauf- oder herunterreguliert waren. Die Anzahl der herunter regulierten Gene übertraf mit 92, die Anzahl der herauf regulierten mit 64 im betrachteten Muster. Besondere Aufmerksamkeit fand die Gruppe der hochregulierten, da sie mit der aktivierenden Funktion von Miz-1 in Beziehung stehen könnte.

In unten stehender Abbildung werden die gefundenen Gene, funktionalen Gruppen zugeordnet, beschrieben. So finden sich Gene der Wachstumssuppression, wie die Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen: p21Cip1 und p57Kip2, der Regulator der TGF- β -Signaltransduktion: HNF-3, oder die dämpfenden wirkenden Regulatoren der Zellzykluskontrolle: das Zinc-finger-protein Zac1 und der Gut enriched Kruppel-like factor Gut4/GKLF. Im Weiteren finden sich Gruppen die Transkriptions-Kontrolle, den Zellstoffwechsel, die Signaltransduktion und den Aufbau der extrazellulären Matrix betreffend. In der Gruppe der der Zelldifferenzierung zuzuordnenden Gene fiel das für die Muskeldifferenzierung wichtige CCAAT / *enhancer binding protein* (C/EBP) alpha auf. Zum Vergleich ist die Gruppe der durch den Myc/Max-Komplex induzierten Gene aufgeführt. Hier fällt kein signifikanter Unterschied im Expressionsniveau auf der mRNA-Ebene auf.

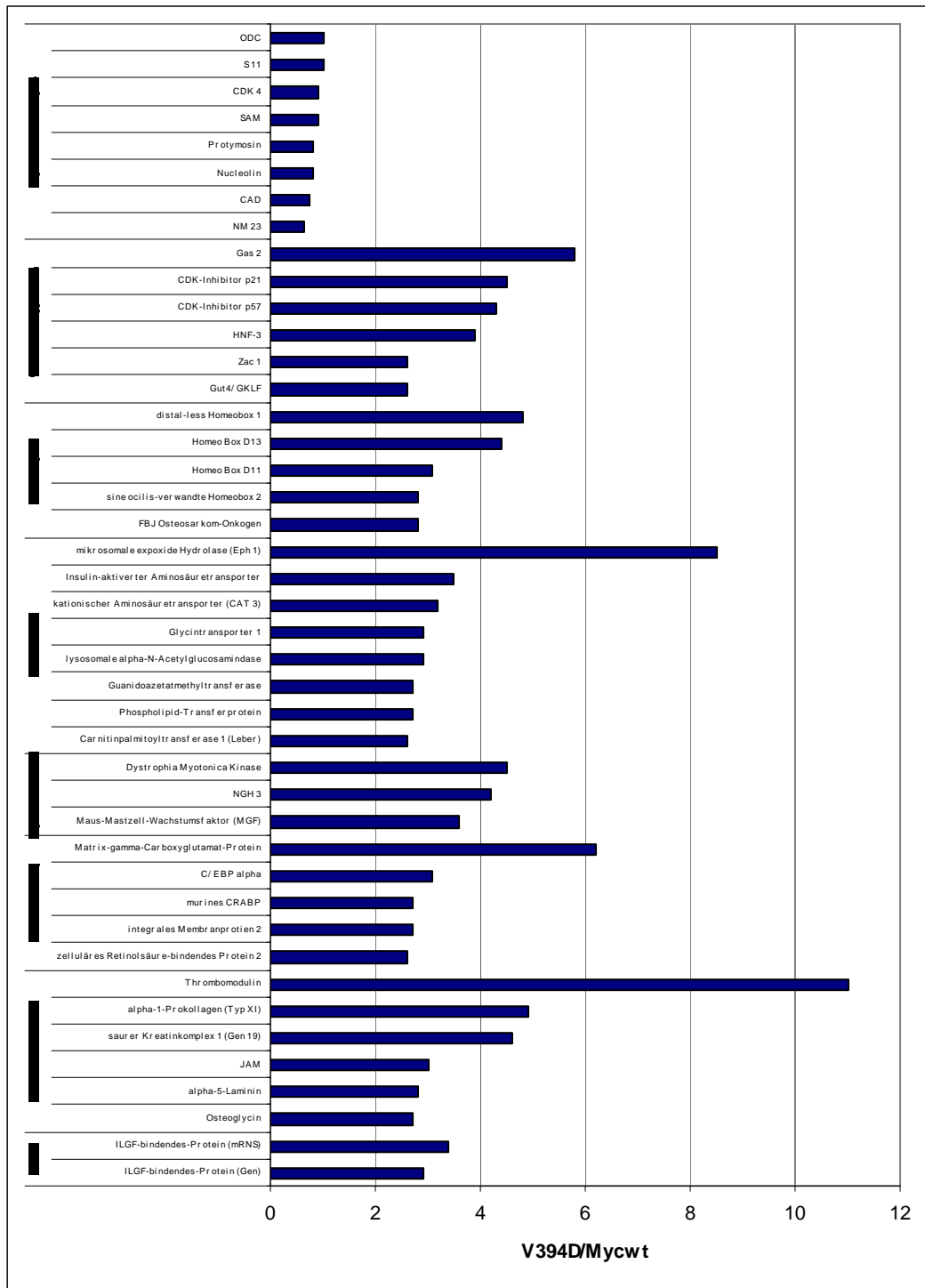


Abbildung 4.11: Microarray-Vergleich des RNS-Profiles von MycV394D- und Mycwt-infizierten Maus-Embryo-Fibroblasten. Mefp53^{+/-}-Zellen wurden mit MycV394D und Mycwt infiziert und selektioniert. Das Diagramm zeigt die Gene, die in den MycV394D-infizierten Zellen gegenüber den Mycwt-infizierten Zellen höher exprimiert wurden. Zum Vergleich oben Zielgene des Myc/Max-Komplexes ohne Unterschied in der Regulation.

5 Diskussion

5.1 Ergebnisübersicht

Grundlage dieser Arbeit war unter anderem die Feststellung, dass Miz-1 ein Myc-reprimierter Transkriptionsfaktor ist, welcher ein Zielgen, nämlich p15^{ink4b}, in Reaktion auf TGF- β gemeinsam mit Smad-Proteinen reguliert (Seoane et al., 2001). Um die Bindung an Miz-1 konkurrieren hierbei Myc und p300 an überlappenden Bindungsstellen der HLH-Domäne. Anzunehmen ist, dass dies die repressive Wirkung von Myc vermittelt.

Ein Myc-Allel, welches anstelle der nativen eine Mad-HLH-LZ-Domäne aufwies war diesbezüglich bindungsdefizient. Ein Miz-1-vermittelter Wachstumsarrest konnte nicht mehr unterbunden, die Immortalisierung von p53^{-/-}-Zellen nicht mehr vollzogen werden. Auch gemeinsam mit aktivierten Ras-Allelen konnten embryonale Rattenfibroblasten nicht mehr immortalisiert werden. In Luziferase-Assays zeigte sich, dass eine Miz-1-abhängige Transaktivierung nicht durch MycMad inhibiert werden konnte.

Das zentrale Thema der Dissertation war die Beschreibung und Dokumentation der biologischen Eigenschaften spezieller Miz-1-interaktionsdefizienter Myc-Mutationen (MycV394D und MycS405F). Diese sollten Miz-1-bindungsdefizient sein, aber weiterhin mit Max interagieren. Dabei sind Punktmutationen die kleinstmöglichen Veränderungen, die sich auf die Struktur eines Proteins auswirken können. Die Wahrscheinlichkeit, dass hierbei durch nur eine einzige Veränderung ein Effekt erzielt werden kann, also nur ein einziger Aspekt der Interaktion beeinflusst wird, ist dann am größten. Daher sollte sich isoliert die reprimierende Funktion von Myc via Miz-1 untersuchen lassen. Letztlich wurde mit der Variante MycV394D die geeignete Punktmutation gefunden.

Im biologischen Assay wurde diese Punktmutante auf die Effekte von Myc bezüglich der Induktion von Proliferation, Apoptose oder Transformation in ihrer Miz-1-Abhängigkeit geprüft. Hier konnte als erstes gezeigt werden, dass die Mutationen MycV394D und MycS405F keinen signifikanten Wachstumsunterschied im Vergleich mit Myc^{wt} aufwiesen.

Es zeigte sich, dass gegenüber der Expression des leeren Vektors eine relativer Rescue-Effekt, das heißt ein annähern an das Wachstumsverhalten der Wildtyp-Form, bezüglich der mit Mycwt, MycV394D und MycS405F stabil infizierten Zellen auftrat.

In der BrdU-Markierung zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Mycwt, MycV394D und MycS405F. Dies diente der Bestimmung der Teilungsaktivität unter Einfluss der Myc-Überexpression. Es wurde den Zellen das Thymidin-Analogon Bromodeoxyuridin (BrdU) zum Einbau in die zu synthetisierende DNS angeboten. Dies stellte ein Maß für die Teilungsaktivität dar. Die Gruppe, welche die Mutationen überexprimierte, zeigt eine deutlich höhere Inkorporationsrate im Sinne einer erhöhten Teilungsaktivität.

Weitere Informationen lieferte die FACS-Analyse der Zellzyklusverteilung unter Myc-Expression. Zusammengefasst zeigten die Daten, dass sowohl MycV394D als auch MycS405F die Fähigkeit der E-Box-abhängigen Aktivierung beziehungsweise Gen-Expression beibehalten haben und weiterhin Wachstum und programmierten Zelltod in RAT1-Zellen auslösen konnten. In den Rat1-Zellen stimulierten die Genvariationen Mycwt, MycV394D und MycS405F den Eintritt in die S- und G2-Phase.

Zusammengefasst konnte in drei unabhängigen Experimenten und auf drei unterschiedlichen Wegen der Erhalt der aktivierenden Funktion der Mutationen von Myc im biologischen Assay dokumentiert werden.

Der nächste Schritt sollte nun Aufschluss über eine eventuelle Beeinflussung der Miz-1 vermittelten Funktion von Myc erbringen. Übereinstimmend mit der Rolle der Myc/Miz-1-Interaktion in der Suppression der Zellalterung, verminderte die Transfektion sowohl mit Mycwt als auch mit MycS405F den Anteil seneszenter p53^{+/-} Mef-Zellen in der Kultur.

MycV394D konnte die Zellalterung jedoch nur in signifikant geringerem Masse verzögern. Die diesbezügliche Differenz konnte nicht mit einer unterschiedlichen Induktion von p19ARF oder p53 erklärt werden (siehe auch Beuger, 2004), die in Reaktion auf Mycwt und MycV394D aufgetreten wäre.

Den Abschluss bildete die Untersuchung mittels eines Microarray-Vergleiches von MycV394D und Mycwt- infizierten, p53^{+/-} Mef-Zellen. Hier fanden sich potentielle Zielgene von Miz-1 wie p57Kip2, C/EBP α und p21Cip1. Diese sind nun mit schon bekannten biologischen Funktionen beziehungsweise Auswirkungen von Myc in

Zusammenhang zu bringen. Sie können als direkte Zielgene von Miz-1 identifiziert werden (Herold et al., 2002).

Insbesondere in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Miz-1 essentiell für die Induktion von p21Cip1 nach UVB-Bestrahlung ist.

In Zusammenschau mit den Ergebnissen von Vincent Beuger (Beuger 2004) scheint Miz-1 neben seiner Rolle in TGF- β -Signalweg auch in der Differenzierung von Zellen und in der DNS-Schadensantwort eine wichtige Stellung einzunehmen.

5.2 Unterschiede und Übereinstimmungen im biologischen Verhalten von Mycwt, MycV394D und MycS495F

Die Testung von Mycwt und MycV394D in verschiedenen biologischen Assays zeigt Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen beiden Allelen auf. Zwischen MycV394D und Mycwt zeigt sich jedoch bezüglich der Induktion von S-Phase und Apoptose in Rat1-Zellen kein Unterschied.

Widerspricht dies jedoch nicht der vorbeschriebenen inhibitorischen Wirkung hinsichtlich der Zellzyklusregulation, wenn Miz-1 die Expression der Proteine p21Cip1, p15ink4b oder auch p57Kip2 reguliert?

Sowohl die Induktion der S-Phase sowie die Einleitung der Apoptose erfordern die Bindung von Myc an Max. Dies lässt darauf schließen, dass S-Phase und Apoptose von einer transskriptionellen Aktivierung durch Myc abhängig sind. Dieses Erkenntnis deckt sich mit den Ergebnissen der FACS-Analyse. Im Weiteren bindet Myc aber auch an Max, wenn es mit Miz-1 komplexiert vorliegt (Staller et al., 2001). Die genaue Funktion von Max ist hierbei jedoch noch nicht geklärt.

Weitere Daten haben gezeigt, dass der Myc-Miz-1-Komplex unter Zellkulturbedingungen in Kolonkarzinomzellen keine beziehungsweise nur eine untergeordnete Rolle spielt. Im Microarray-Vergleich zeigten sich bei Myc-überexprimierender oder Miz-1-downregulierter Versuchskonstellation praktisch keine Überlappung von regulierten Zellen (Wanzel et al., 2005). Nach Behandlung mit dem Zytostatikum Doxorubicin, welches unter anderem einen Aktivitätsabfall der Enzyme DNS-Polymerase und Thymidinkinase verursacht, fanden sich dagegen eine Vielzahl von Genen, welche von Myc-Miz-1-Komplex reguliert wurden. Die Expression des Miz-1-Zielgenes p21CIP1 wurde nach UVB-Bestrahlung von Mycwt-infizierten Zellen reprimiert, von MycV394D-infizierten hingegen nicht. Ohne die Radiatio zeigten sich jedoch keine Expressions-Unterschiede von p21CIP1, ohne Unterschied ob die Zellen

mit Mycwt oder MycV394D infiziert worden waren (Herold et al., 2002). Daher scheint die basale p21CIP1-Expression nicht durch Miz-1 reguliert. Bezüglich der vorliegenden Arbeit ist zu bedenken, dass keine gezielte Überexpression von Miz-1 erfolgte. Da endogenes Mycwt in den verwendeten Rat1-Zellen vorhanden ist, kann der endogene Myc-Level zur Repression anderer Zielgene des Myc-Miz-1-Komplexes ausgereicht haben.

Gezielte Eingriffe in die HLH-LZ-Domäne von Myc und Max konnten bereits einen Beitrag zum Verständnis der Funktion des Myc-Max-Heterodimers leisten (Amati et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, dass die Heterodimerisierung von Myc und Max erforderlich für die onkogene Wirkung von c-Myc ist. Dabei wurden chimäre Allele von Myc und Max, welche die HLH-LZ-Domäne des Bindungspartners anstelle der eigenen besaßen verwendet. In Analogie erfolgt eine reziproke Änderung der Allele von Myc und Max bezüglich der geladenen Aminosäuren der LZ-Domäne. Es konnte beobachtet werden, dass die mutierten Allele von Myc nur dann eine Transformation initiieren konnten, wenn sie mit den komplementären Max-Allelen dimerisierten. Ein weiterer Beitrag zum Verständnis des Myc-Miz-Komplexes konnte durch die Verwendung von MycMad-Mutanten erbracht werden (Staller et al., 2001).

5.3 Potentielle Miz-1 Zielgene

Die Repression von Genen durch Miz-1 ist bisher nicht ausreichend geklärt. Miz-1 gehört aber zu den POZ-Zinkfinger-Proteinen, welche mehrheitlich Gene reprimieren. Gleichzeitig gibt es jedoch auch Ausnahmen wie ZF5, welches sowohl Gene aktivieren als auch reprimieren kann (Kaplan et al., 1997). Beide Funktionen benötigen die POZ-Domäne. Diese interagieren mit den Corepressoren N-CoR und SMRT, wie eine mögliche Erklärung von Huynh et al. (1998) zeigt. Aber auch die Repression des mit der menschlichen Differenzierung in Zusammenhang stehenden Genes *n-myc downstream regulated gene 2 (NDRG2)* durch Myc über eine Miz-1-abhängige Interaktion mit dem *NDRG2*-Core-Promotor, also den Promotorbereich in unmittelbarer Nähe des transkriptionellen Startpunktes, zeigt eine Möglichkeit auf (Zhang et al., 2006). Für die hier beschriebene c-Myc-abhängige Repression von *NDRG2* ist die Assoziation mit Miz-1 und eventuell auch weiteren epigenetischen Faktoren, wie zum Beispiel der Histondeacetylasen, notwendig. Die regulatorische

Funktion von Myc für NDRG2-Genexpression implizierte eine weitere, wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung.

In Bezug auf hochregulierte Gene waren in der Untersuchung zwei Gene auffällig, welche schon zuvor als Myc-reprimiert bekannt waren: p21Cip1 (Coller et al., 2000; Gartel et al., 2001; und andere) und C/EBPalpha (Li et al., 1994). Coller und Mitarbeiter führten hierzu Expressions-Analysen mit Oligonucleotid-Microarrays durch. Sie zeigten, dass Myc Gene regulierte, welche in die Wachstums- und Zellzykluskontrolle sowie Signaltransduktion und Adhäsion involviert sind. Um direkt von indirekt induzierten Genen zu unterscheiden, wurde die Protein *de novo* Synthese mittel eines Cycloheximid-Systems unterbunden. Es konnte gezeigt werden, dass es einen Myc-Komplex gibt, der direkt Zielgene, und hierunter befand sich p21Cip1, reprimieren kann.

Weitere Untersuchungen mittels Northern Blots, welche in der Arbeit von Vincent Beuger (2004) nachzulesen sind, zeigten für eine Auswahl der im Microarray gefundenen potentiellen Miz-1-Zielgene, dass diese tatsächlich durch Mycwt reprimiert wurden. Chromatin-Immunpräzipitationen bewiesen, dass Miz-1 und Myc direkt an die Core-Promotoren von p21Cip1, p57Kip2 und C/EBPalpha binden. Für Zac-1 konnte lediglich Myc, aber nicht Miz-1 auf dem Core-Promotor detektiert werden. Der Repressionsmechanismus bleibt bisher ungeklärt.

Entscheidend für die Gesamtbetrachtung bleibt, dass sowohl Mycwt als auch MycV394D durch die Assoziation mit Max eine Vielzahl von Genen induzierte, welche einen positiven Effekt auf die Zellproliferation haben. Überwiegt dieser Stimulus bezüglich des Miz-1-abhängigen Effektes zum Zellzyklus- beziehungsweise G1-Arrest, wäre eine Aufhebung der Miz-1-vermittelten Zellzyklus-Kontrolle die Folge.

5.3.1 p21Cip1 als direktes Zielgen von Miz-1 in der DNS-Schadensantwort

Im Anschluss an die Betrachtung der Bedeutung von Miz-1, dem Myc-interagierenden Protein, zum Beispiel im Kontext einer DNS-Schadensantworten stellt sich die Frage, welche Rolle Myc in der Miz-1 vermittelten Schadensantwort spielt.

Myc kann Miz-1 durch Komplexbildung in seiner Funktion hemmen, was durch zahlreiche Arbeiten bekannt war. Die Repression der *p15INK4B*-Expression durch Myc erfolgt unter anderem durch die Interaktion mit Miz-1. Myc hemmt durch Komplexierung mit Miz-1 und über die Blockierung der Bindestelle des Koaktivators *p300* die Transkriptions-Aktivierung des *p15INK4B*-Initiator-Element (INR) (Staller et

al., 2001). Diese Expression von Myc kann die Aktivierung von *p21cip1* hemmen (Herold et al., 2002). Die *p21cip1*-Expression in der UV-induzierten p53-abhängigen Schadensantwort ist abhängig von Miz-1.

Berücksichtigt man bei der Überlegung, auf welche Weise Myc in die Miz-1-abhängige Schadensantwort UV-behandelter Zellen eingreift, ergibt sich, dass Myc ein negativer Regulator der UV-induzierten DNS-Schadensantwort durch seine Interaktion mit Miz-1 ist.

Diese Rolle des Myc/Miz-1-Komplexes in dieser DNS-Schadensantwort wurde durch den Einsatz der Punktmutante MycV394D verifiziert. Die getestete Mutante ist zur Transaktivierung von Myc-Zielgenen fähig, aber in der Bindung zu Miz-1 defekt. Im Vergleich zum Wildtyp-Myc wurde im Weiteren durch die Myc-Mutante die UV-induzierte Expression von p21Cip1 nicht reprimiert (Herold et al., 2002). Dabei wurden p19ARF^{-/-}-Zellen verwendet, um eine Stabilisierung von p53 durch p19ARF, welches durch Mycwt und MycV394D induziert wird, zu verhindern. Die MycV394D infizierten Zellen zeigen außerdem einen verzögerten Wiedereintritt in den Zellzyklus gegenüber Mycwt infizierten. Dieser Effekt hat jedoch nichts mit einer eingeschränkten Funktion von p53, welches in MycV394D und Mycwt infizierten Zellen nach UVB-Bestrahlung induziert wurde, zu tun (Herold et al., 2002). Reduziert man die Miz-1-RNS-Level in einer RNS-Interferenz, so konnte p21Cip1 nicht mehr durch UVB-Bestrahlung induziert werden. Miz-1 ist also essentiell für die UVB induzierte p21Cip1-Expression (Herold et al., 2002).

Das p21Cip1 überhaupt im hier durchgeführte Microarray ohne vorausgegangene DNS-Schädigung dokumentiert wurde, kann daran liegen, dass die genutzten Mefp53^{+/-}-Zellen durch die Stressreaktion der Zellkultur-Behandlung p21Cip1 exprimierten (Sherr et al., 2000).

Die Expressionslevel von Myc beeinflussen das Verhalten der Zelle zum Eintritt in den G1-Arrest oder zur Induktion der Apoptose (Seoane et al., 2002). Hohe Mengen an Myc können demnach gleichzeitig p53 induzieren und Miz-1 hemmen und somit die Induktion der Apoptose triggern. Geringere Mengen an Myc scheinen Miz-1 in nicht ausreichendem Maße zu hemmen und dadurch einen G1-Eintritt zu ermöglichen. Bisher konnte jedoch noch kein Vergleich gezogen werden, wie sich das endogene Expressionslevel von Myc nach unterschiedlich intensiver Schädigung der DNS verhalten.

5.4 Die Verbindung zwischen Myc und p53

Zellen können in Reaktion auf die Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 in den Zellzyklusarrest eintreten oder den programmierten Zelltod aktivieren. Es konnte gezeigt werden, dass Myc die Induktion der Apoptose durch die Unterdrückung der Expression von p21Cip1, einem Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor mit antiapoptotischer Funktion, unterstützt. Maligne Entartung ist das Resultat zellulärer Anarchie (Vousden, 2002). Eine Reihe von Kontrollpunkten soll daher sicherstellen, wann und wo Proliferation und Fortbestehen erfolgen kann. Ein integraler Bestandteil dieses Ablaufes ist p53. Es kann den programmierten Zelltod induzieren und somit fehlerhafte Zellen entfernen. In manchen Situationen jedoch induziert es lediglich einen Zellzyklusarrest, der prinzipiell reversibel ist und zur Rehabilitation der betroffenen Zelle führen kann (Vousden et al., 2002). Die Aktivierung von Proteinen wie Myc, welche die Zellproliferation beschleunigen können, unterbindet gleichzeitig die Reaktion auf die p53-Aktivierung in Bezug auf die Apoptose-Induktion. Diese Desregulation der Proliferation ist ein kritisches Ereignis, das für jede Form der Kanzerogenese notwendig ist (Evan et al., 2001). Zwei Modelle werden zur Erklärung der unterschiedlichen p53-Wirkung angeführt. Das erste schlägt vor, dass im Rahmen des Prozesses des malignen Voranschreitens, Zellen Todessignalen ausgesetzt sind, die zusammen mit p53 eine apoptotische Schwelle erreichen. Die Aktivität von p53 bleibt nach wie vor die gleiche. Das Ergebnis wird bestimmt durch das Vorhandensein oder Fehlen von zusätzlichen Signalen (Vousden et al., 2002).

Im zweiten Modell wird die Reaktion durch die Veränderungen in der Funktion von p53 selbst beziehungsweise durch die differenzielle Regulation von p53 in Bezug auf DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivität bestimmt. Die Phosphorylierung von p53 und die Verfügbarkeit von apoptotischen Kofaktoren sind für die transkriptionelle Aktivierung von einigen apoptotischen Zielgenen notwendig, aber entbehrlich für die Induktion von Genen zur Vermittlung des Zellzyklusarrestes.

Der Wechsel zu einer apoptotischen Reaktion reflektiert wahrscheinlich die Expression oder Aktivierung kritischer Kinasen oder Kofaktoren für p53 um apoptotische Zielgene zu induzieren; Krebszellen überleben, weil diese Faktoren verloren gingen oder mutierten (Vousden et al., 2002). Seoane et al. (2002) haben einen neuen Mechanismus aufgedeckt, durch den Myc die p53-Reaktion im Sinne einer Apoptose ändern kann, indem die Expression eines p53-induzierten Inhibitors des Zelltods blockiert wird. Obwohl die p21CIP1-Promotoren stark auf p53 reagieren, ist es jetzt offensichtlich,

dass ein anderer Transkriptionsfaktor, nämlich Miz-1, auch eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der p21CIP1-Expression spielt (Herold et al., 2002; Seoane et al., 2002; van de Wetering et al., 2002). Wie p53 kann Miz-1 als Reaktion auf Stress aktiviert werden, und beide Transkriptionsfaktoren sind für die Induktion der p21CIP1-Expression notwendig (Herold et al., 2002). Wie schon berichtet resultiert die Interaktion von Myc und Miz-1 in der Reprimierung der p21Cip1-Transkription, selbst in der Gegenwart von aktiviertem p53.

Diese Beobachtung kann erklären, wie die Myc-Expression die p53-vermittelte Blockade des Zellzyklusprogresses überwinden kann. Außerdem ist die Regulierung der Tätigkeit von p21CIP1 durch diese Myc-Miz-1-Interaktion wichtig bei der Regulierung zwischen Proliferation und Differenzierung (van de Wetering et al., 2002). Jedoch hat p21CIP1 eine weitere weniger gut erforschte Rolle in der Fähigkeit Zellen vor der p53-induzierten Apoptose zu schützen. Beim Entfernen der Blockade des Zellzyklus raubt Myc den Zellen auch ihre Überlebenssignale. Dies ist wichtig, weil die Wirkung von Myc auf p21CIP1-Expression durch Miz-1 vermittelt wird, ohne die p53-Funktion direkt zu beeinträchtigen. Dies bedeutet, dass die Aktivierung der Expression anderer p53-Zielgene, wie zum Beispiel die proapoptotische Proteine PUMA und PIG3 unberührt bleibt (Seoane et al., 2002). Dies lässt vermuten, dass die Apoptose aufgrund des Verlustes der schützenden Wirkung durch p21CIP1 zu Stande kommt. Das Modell könnte eine einfache und elegante, aber auch eine unvollständige Ansicht darstellen, wie Myc Zellen für den programmierten Zelltod sensibilisiert (Vousden, 2002).

Die Mutante MycV394D bleibt kompetent im Bindungsverhalten an Max und in ihrer Funktion als Transkriptions-Aktivator, welches die These, dass ein Teil der durch Myc-induzierten, apoptotischen Signale abhängig von der Aktivierung der Genexpression ist, stützt.

Unter bestimmten Bedingungen führt die Hemmung der p53-vermittelten Apoptose zu einem Zellzyklus-Arrest, was darauf hindeutet, dass die Funktion des Zellzyklus-Arrestes in Zellen, welche bereits zum Zelltod bestimmt sind, intakt bleibt. Die Folgerung daraus ist, dass die Reaktion auf die p53-Aktivierung entweder nur die Induktion des Zellzyklus-Arrestes oder die Induktion von beidem, Zellzyklus-Arrest und vorrangiger Apoptose, ist. Die Vorstellung, dass die Apoptose ein zusätzlichen Schritt ist, welche den Zellzyklus-Arrest überlagert, passt gut zu der Idee, dass unveränderte Formen von p53, welche in relativ normalen Zellen induziert werden können, nur die Expression von Zielen des Zellzyklus-Arrestes aktivieren, und dass

posttranscriptionale Änderungen oder Cofaktoren notwendig sind, um die Apoptose selbst zu aktivieren (Vousden, 2002). Neuen Studien zeigen eine zusätzliche Komplexität auf, da selbst wenn Gene des Zellzyklus-Arrestes und Zielgene der Apoptose durch p53 induziert werden, kann das Ergebnis möglicherweise doch nur ein Zellzyklus-Arrest sein. In diesem Fall würde die Apoptose nicht einfach den Zellzyklus-Arrest überlagern.

Was also macht p21Cip1, um die Zelle vor der Induktion der Apoptose zu schützen?

Es wurde vermutet, dass ein verstärktes Auftreten des programmierten Zelltodes dem Verlust von p21Cip1 folgt, da es zu einer vermehrten p53-Expression kommt, und damit zu einer Erhöhung des p53-induzierten, apoptotischen Signalweges (Javelaud et al., 2002).

Die p21Cip1-Expression kann vor der Induktion der Apoptose schützen ohne zu einer deutlichen Veränderung der p53-Aktivität zu führen (Seoane et al., 2002).

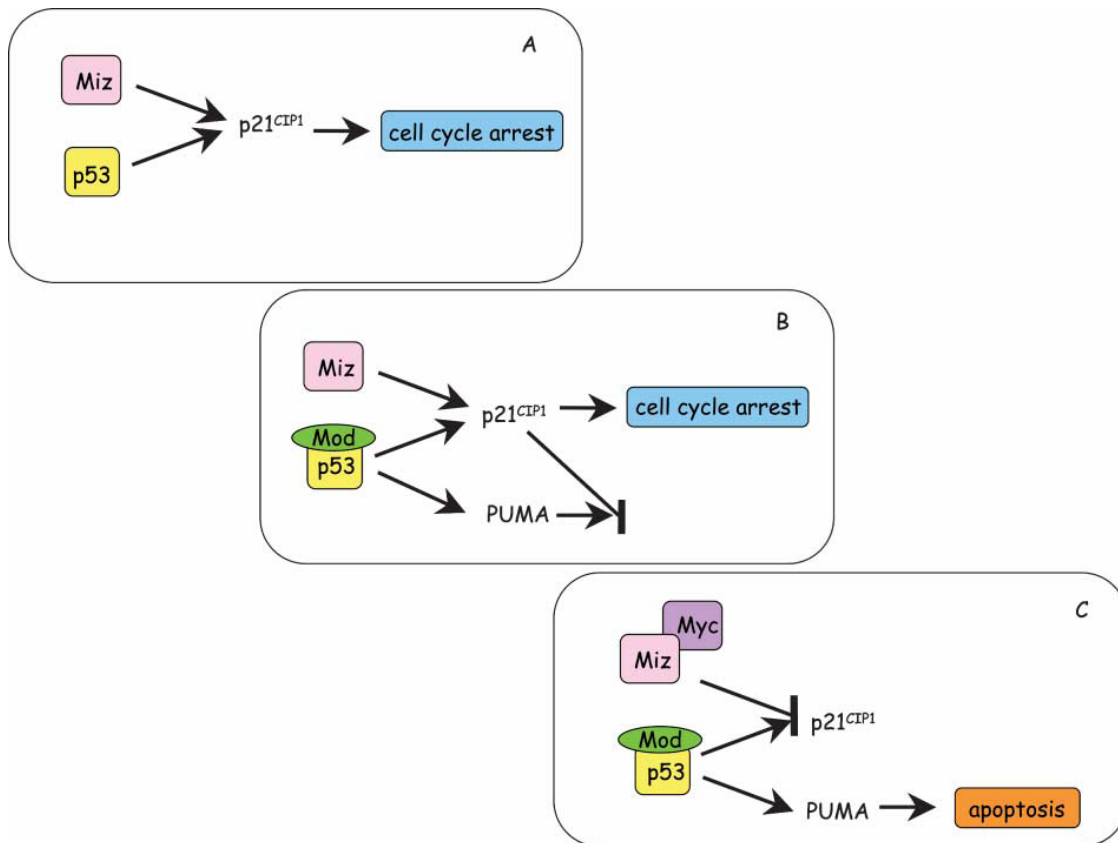
Diese Autoren zeigten, dass die Präsenz von p21Cip1 nicht vor der Induktion der Apoptose durch die Verringerung der p53-vermittelten Akkumulation apoptotischer Proteine wie PUMA oder PIG3 (Seoane et al., 2002) schützt, was darauf hindeutet, dass p21Cip1 die apoptotischen Abläufe unterhalb (*downstream*) des p53-Weges behindern kann (Vousden, 2002). Dies zeigt die Möglichkeit von p21Cip1 die Aktivierung von E2F1 zu blockieren, ein weiterer Transkriptionsfaktor mit apoptotischer Funktion.

Zusammenfassend ist dies ein weiterer Schritt im Verständnis, wie die Wahl der Antwort auf p53 geregelt ist, wirft jedoch auch neue Fragen auf.

Kann p53 die Expression anderer antiapoptotischer Proteine induzieren, welche eine ähnliche Rolle gegenüber p21CIP1 spielen und auf die Regulierung einflussnehmen, selbst wenn die p21Cip1-Levels gleich bleiben?

Funktionieren andere Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen, wie p27Kip1, in ähnlicher Art und Weise?

Beruhet die Art der Reaktion auf eine p53-induziert durch andere Stresssignale auch auf der Downregulation von p21Cip1?



(modifiziert nach Vousden, 2002.)

A Die Aktivierung von p53 in normalen Zellen beruht auf der selektiven Expression einer Gruppe von p53-Zielgenen. Diese vermitteln den Zellzyklus-Arrest, nicht aber die Apoptose. Die Expression von p21Cip1 hängt von der Aktivierung von p53 und Miz-1 ab.

B In Reaktion auf onkogene Veränderungen treten Modifikationen auf oder binden Coaktivatoren p53 und ermöglichen die Aktivierung der Apoptose, zum Beispiel PUMA. Allerdings können p53 - induzierbare Gene wie p21CIP1 die Umsetzung der apoptotischen Reaktion blockieren.

C Ein weiteres Signal, wie zum Beispiel dereguliert exprimiertes Myc, wird für die Hemmung der p21Cip1-Expression durch den Myc/Miz-1-Komplex und die Induktion der Apoptose benötigt.

5.5 Myc und p57Kip2

Die Expression von p57Kip2 ist während der Myoblastendifferenzierung erhöht (Kitzmann et al., 2001). In transienten Infektionen konnte die transkriptionelle Aktivierung des Muskel-Kreatin-Kinase-Promotors durch den muskelspezifischen Transkriptionsfaktor MyoD erhöht werden, indem man Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren, hier p57Kip2, transfizierte. Dabei induzierten die Mitglieder der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p57Kip2, p21 Cip1 und p27Kip1 erhöhte MyoD-Level. Die erhöhte Expression von p57Kip2 unterdrückte die CDK2/CyclinE-vermittelte Phosphorylierung von MyoD, welches hierauf nicht mehr abgebaut werden konnte (Reynaud et al., 1999). Nach retroviralem Gentransfer von c-myc konnte eine Inhibition der Fusion während der Differenzierung zu Skelettmuskelfasern beobachtet werden. Die Zellen waren transformiert. Sie zeigten jedoch während der Differenzierung keine Änderung in der Expression der muskelspezifischen Gene MHC (Myosin heavy chain), Myosin (leichte Kette) und der Muskel-Kreatinin-Kinase. Auch die Expression der muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren für MyoD war unverändert. Eine Differenzierung war also trotz Transformation noch möglich. Andererseits wurde bereits gezeigt, dass Myc die MyoD-Expression während der Proliferation senken kann (Crescenzi et al., 1994).

Andererseits wurde gezeigt, dass v-Myc in Myoblasten die Expression von regulatorischen Elementen im qmyoD-Promotor (Wachtelmyoblasten) reprimieren kann und damit die terminale Differenzierung dieser Zellen inhibiert. Eine Überexpression von qmyoD konnte wiederum den v-Myc induzierten Effekt überkommen (La Rocca et al., 2002).

Miz-1 könnte demnach die Expression von p57Kip2 und p21Cip1 erhöhen und somit den muskelspezifischen Transkriptionsfaktor MyoD stabilisieren, welcher essentiell für die Differenzierung ist. Diese Annahme müsste jedoch durch weitere Dokumentationen validiert werden.

6 Zusammenfassung

C-Myc ist ein Transkriptionsfaktor der Helix-Loop-Helix/Leuzinzipper-Familie. Er kann sowohl Gene aktivieren, als auch reprimieren, und spielt eine Schlüsselrolle in der Induktion und Repression von Proliferation und Apoptose und in der Differenzierung. Für die Aktivierung ist eine Dimerisierung mit dem Partnerprotein Max erforderlich. Dies ermöglicht die Bindung des Myc-Max-Heterodimers beziehungsweise –Tetramers an das sogenannte E-Box-Element im Promotor. Es wurden auch verschiedene Myc-bindende Proteine gefunden, welche gemeinsam einen Gen-reprimierenden Komplex bilden. Eines dieser vorbeschriebenen Proteine ist das Myc interacting zinc finger protein 1 oder abgekürzt Miz-1. Dieser Transkriptionsfaktor aktiviert den Zellzyklusinhibitor p15^{ink4b} nach TGF- β -Wirkung über ein Initiator-Element. Myc wiederum reprimiert Miz-1, indem es mit dem Cofaktor p300 um dieselbe Bindungsstelle an Miz-1 konkurriert. Miz-1 bindet ebenso wie Max an die HLH-Domäne von Myc und liegt in einem tertiären Komplex mit Myc und Max vor.

Anliegen dieser Dissertation war es einen Beitrag zur Klärung des Ausmaßes der reprimierenden Funktion von Myc durch den Myc-Miz-1-Komplex in der Biologie der Zelle zu leisten. Hierzu lagen zwei Formen von in der HLH-Domäne punktmutierten Allelen von c-Myc vor: MycV394D und Myc S405F. Diese wurde in dieser Arbeit biologisch charakterisiert. Initial wurden die biochemisch Miz-1-bindungsdefizienten Mutanten hinsichtlich ihrer aktivierenden Funktion mit Max untersucht. Sie zeigten bezüglich Teilungsverhalten, Zellzyklusverteilung und Wachstum die gleichen Effekte im biologischen Assay wie Mycwt (Wildtyp). Im nächsten Schritt wurden die Formen in Mefp53^{+/-} Zellen auf Unterschiede in der Beeinflussung der Zellalterung (Seneszenz) verglichen. Hier zeigte MycV394D eine Verzögerung der Zellalterung, welche nicht mit einer unterschiedlichen Induktion von p19ARF oder p53 erklärt werden konnte.

Um potentielle Zielgene von Miz-1 zu identifizieren wurden nun in einem Microarray Mycwt-inifizierte mit MycV394D-infizierten Mefp53^{+/-} verglichen. Während Gene der Myc-Induktion von Mycwt und MycV394D in gleichem Maße reguliert wurden, zeigten eine Reihe von Genen, welche in Proliferation, Adhäsion und Transkription eine Rolle spielen, in MycV394D-infizierten Zellen eine höhere Expression als in Mycwt-infizierten-Zellen. Drei dieser Gene, nämlich p21Cip1, p57Kip2 und C/EBP-alpha,

konnten später als direkte Zielgene von Miz-1 identifiziert werden. In der Arbeit von Herold et al. (2002), in welche die Ergebnisse dieser Dissertation eingingen, konnte Miz-1 durch die Nutzung von MycV394D zudem als essentielles Protein für die UV-induzierte p21Cip1-Expression ausgemacht werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Myc zwei biochemische Fähigkeiten vereint und konserviert hat: durch Max zu aktivieren und durch Miz-1 zu reprimieren. Zielgene in der Gen-Repression wurden aufgezeigt. Die weitere Aufklärung der Wertigkeit und Komplexität, welche die Interaktion vom Myc und Miz-1 in der Tumorgenese einnehmen, kann zukünftig mit transgenen und Knock in-Modellen unter Gebrauch der Mutante MycV394D erfolgen.

7 Summary

C-myc is a transcription factor of the helix-loop-helix/leuzinzipper-family. It can both activate as well as repress gene expression. More over, it plays a key role in the induction and repression of proliferation, apoptosis and differentiation. For activation of gene transcription a dimerization with its partner protein Max is required. This allows the binding of the Myc-Max-heterodimer or -tetramer to the so called E-box element in the promoter. Various Myc-binding proteins have been found, which can form a complex with Myc for gene repression. One of these proteins is the formally described Myc interacting zinc finger protein 1, abbreviated as Miz-1. This transcription factor activates the cell cycle inhibitor p15^{ink4b} via a TGF- β driven pathway. Myc on the other side represses Miz-1 by using the cofactor p300 the same binding site on which Miz-1 competes. Miz-1 as well as Max bind to the HLH domain of Myc and is located in a tertiary complex with Myc and Max.

The purpose of this dissertation was to contribute to the clarification of the repression of Myc by the Myc-Miz-1-complex in the biology of the cell. Therefore two forms of the HLH domain mutated alleles of c-myc were applied: MycV394D and MycS405F, which have been biologically characterized in this work. The biochemically Miz-1-interaction deficient mutants were analyzed in terms of their activating function with Max. They showed the same effect on cell division, cell cycle distribution and growth behavior in the biological assay as Mycwt (wild type). In the next step the mutations were compared in Mefp53^{+/-} cells due to differences in the influence to cellular aging (senescence). MycV394D showed a delay of cell aging, which could not be explained by a different induction of p19ARF or p53.

To identify potential target genes of Miz-1, Mycwt and MycV394D infected Mefp53^{+/-} have been compared by a microarray analysis. While the genes induced by Myc were regulated by Mycwt and MycV394D in the same way, a number of genes, which play a role in proliferation, adhesion and transcription, showed a higher expression in MycV394D-infected than in Mycwt-infected cells. Three of these genes identified, namely p21^{Cip1}, p57^{Kip2} and C/EBP- α , were later considered as a direct target genes of Miz-1. In the work of Herold et al. (2002), in which the results of

this dissertation were published, Miz-1 could be identified by the use of MycV394D also as an essential protein of UV-induced p21Cip1 expression.

After all it can be suggest, that Myc proteins have integrated and conserved at least two distinct biochemical properties: the ability to activate through Max and the ability to repress through Miz-1. The precise importance of the complex formation between Myc and Miz-1 in tumorigenesis can in future be addressed with appropriate transgenic and knockin models making use of the MycV394D mutant.

8 Literaturverzeichnis

Adhikary S, Peukert K, Karsunky H, Beuger V, Lutz W, Elsasser HP, Moroy T, Eilers M (2003) *Miz1 is required for early embryonic development during gastrulation*. Mol Cell Biol 23: 7648-7657.

Amati B, Littlewood TD, Evan GI, Land H (1993) *The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max*. EMBO J 12:5083-5087.

Beuger V (2004) *Unterscheidung zwischen der aktivierenden und reprimierenden Funktion von c-Myc*. Marburg, Philipps-Universität, Fachbereich Humanmedizin, Diss.

Brown O, Botstein D (1999) *Exploring the new world of the genome with DNA microarrays*. Nat Genet 21: 33.

Coller HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Lander ES, Eisenman RN, Golub TR (2000) *Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A 97:3260-3265.

Crescenzi M, Crouch DH, Tatò F (1994) *Transformation by myc prevents fusion but not biochemical differentiation of C2C12 myoblasts: mechanisms of phenotypic correction in mixed culture with normal cells*. J Cell Biol 125: 1137-1145.

DeRisi J, Iyer V, Brown P (1997) *Exploring the metabolic and genetic control of gene expression in a genomic scale*. Science 278: 680-686.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al (1995) *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A 92:9363-9367.

Eilers M, Schirm S, Bishop JM (1991) *The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene*. EMBO J 10: 133-141.

Evan GI, Vousden KH (2001) *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer*. Nature 411: 342-348.

Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC (1992) *Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein*. Cell 69: 119-128.

Freytag SO, Geddes TJ (1992) *Reciprocal regulation of adipogenesis by Myc and C/EBP alpha*. Science 256: 379-382.

Gartel AL, Goufman E, Najmabadi F, Tyner AL (2000) *Sp1 and Sp3 activate p21 (WAF1/CIP1) gene transcription in the Caco-2 colon adenocarcinoma cell line*. Oncogene 19: 5182-5188.

Gartel AL, Ye X, Goufman E, Shianov P, Hay N, Najmabadi F, Tyner AL (2001) *Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3*. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 4510-4515.

Grandori C, Cowley SM, James LP, Eisenman RN (2000) *The myc/max/mad network and the transcriptional control of cell behavior*. Annu Rev Cell Dev Biol 16: 653-699.

Hanahan D, Weinberg RA (2000) *The hallmarks of cancer*. Cell 100: 57-70.

Henriksson M, Lüscher B (1996) *Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation*. Adv Cancer Res 68: 109-182.

Herold S, Wanzel M, Beuger V, Frohme C, Beul D, Hillukkala T, Syvaoja J, Saluz HP, Haenel F, Eilers M (2002) *Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1*. Mol Cell 10: 509-521.

Huynh KD, Bardwell VJ (1998) *The BCL-6 POZ domain and other POZ domains interact with the co-repressors N-CoR and SMRT*. Oncogene 17: 2473-2484.

Javelaud D, Besancon F (2002) *Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14ARF and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio.* J Biol Chem 277: 37949-37954.

Kaplan J, Calame K (1997) *The ZIN/POZ domain of ZF5 is required for both transcriptional activation and repression.* Nucleic Acids Res 25:1108-1116.

Keath EJ, Kelekar A, Cole MD (1984) *Transcriptional activation of the translocated c-myc oncogene in mouse plasmacytomas: similar RNA levels in tumor and proliferating normal cells.* Cell 37: 521-528.

Kime L, Wright SC (2004) *Mad4 is regulated by a transcriptional repressor complex that contains Miz-1 and c-Myc.* Biochem J 370: 291-298.

Knudson AG Jr (1991) *Overview: genes that predispose to cancer.* Mutat Res 247: 185-190.

La Rocca SA, Vannucchi S, Pompili M, Pinney DF, Emerson CP Jr, Grossi M, Tatò F (2002) *Selective repression of myoD transcription by v-Myc prevents terminal differentiation of quail embryo myoblasts transformed by the MC29 strain of avian myelocytomatosis virus.* Oncogene. 2002 21: 4838-4842.

Li LH, Nerlov C, Prendergast G, MacGregor D, Ziff EB (1994) *c-Myc represses transcription in vivo by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II.* EMBO J 13: 4070-4079.

Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ (1999) *High density synthetic oligonucleotide arrays.* Nat Genet 21: 20-24.

Mateyak MK, Obaya AJ, Adachi S, Sedivy JM (1997) *Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination.* Cell Growth Differ 8: 1039-1048.

Menssen A, Hermeking H. (2002) *Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes*. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 6274-6279.

Nau MM, Brooks BJ, Battey J, Sausville E, Gazdar AF, Kirsch IR, McBride OW, Bertness V, Hollis GF, Minna JD (1985). *L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer*. Nature 318:69-73.

Peukert K, Staller P, Schneider A, Carmichael G, Hanel F, Eilers M (1997) *An alternative pathway for gene regulation by Myc*. Embo J 16: 5672-5686.

Reynaud EG, Pelpel K, Guillier M, Leibovitch MP, Leibovitch SA (1999) *p57(Kip2) stabilizes the MyoD protein by inhibiting cyclin E-Cdk2 kinase activity in growing myoblasts*. Mol Cell Biol 19:7621-7629.

Roy AL, Meisterernst M, Pognonec P, Roeder RG (1991) *Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF*. Nature 354: 245-248.

Schober D (2002) *Microarrays, Geneexpressionsanalyse und Bioinformatik*. BIOSpektrum 8: 307-310.

Schwab M, Varmus HE, Bishop JM, Grzeschik KH, Naylor SL, Sakaguchi AY, Brodeur G, Trent J (1984) *Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc*. Nature 308: 288-291.

Sears R, Leone G, DeGregori J, Nevins JR (1999) *Ras enhances Myc protein stability*. Mol Cell 3: 169-179.

Seoane J, Pouponnot C, Staller P, Schader M, Eilers M, and Massague J (2001) *TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b*. Nat Cell Biol 3: 400-408.

Seoane J, Le HV, Massagué J (2002) *Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage*. Nature 419: 729-734.

Sheiness D, Bishop JM (1979) *DNA and RNA from uninfected vertebrate cells contain nucleotide sequences related to the putative transforming gene of avian myelocytomatosis virus*. J Virol 31: 514-521.

Sherr CJ, DePinho RA (2000) *Cellular senescence: mitotic clock or culture shock?* Cell 102: 407-410.

Shrivastava A, Saleque S, Kalpana GV, Artandi S, Goff SP, Calame K (1993) *Inhibition of transcriptional regulator Yin-Yang-1 by association with c-Myc*. Science 262: 1889-1892.

Spotts GD, Patel SV, Xiao Q, Hann SR (1997) *Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins*. Mol Cell Biol 17: 1459-1468.

Staller P, Peukert K, Kiermaier A, Seoane J, Lukas J, Karsunky H, Moroy T, Bartek J, Massague J, Hanel F, Eilers M (2001) *Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1*. Nat Cell Biol 3: 392-399.

Steiner P, Rudolph B, Müller D, Eilers M (1996) *The functions of Myc in cell cycle progression and apoptosis*. Prog Cell Cycle Res 2:73-82.

Theodosiou NA, Tabin CJ (2003) *Wnt signaling during development of the gastrointestinal tract*. Dev Biol 259: 258-271.

Trümper L, Pfreundschuh M (2004) *Wachstumsregulation und Neoplasie*. In: Pfreundschuh M, Schölmerich J (Hrsg.) Pathophysiologie und Pathobiochemie. Urban & Fischer, München.

van de Wetering M, Oving I, Muncan V, Pon Fong MT, Brantjes H, van Leenen D, Holstege FC, Brummelkamp TR, Agami R, Clevers H (2003) *Specific inhibition of gene*

expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. EMBO Rep 4: 609-615.

van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H (2002) *The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. Cell* 111: 241-250.

Vidal M, Braun P, Chen E, Boeke JD, Harlow E (1996) *Genetic characterization of a mammalian protein-protein interaction domain by using a yeast reverse two-hybrid system. Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10321-10326.

Vousden KH (2002) *Switching from life to death: the Miz-ing link between Myc and p53. Cancer Cell* 2: 351-352.

Vousden KH, Lu X (2002) *Live or let die: the cell's response to p53. Nat Rev Cancer* 2: 594-604.

Wanzel M, Kleine-Kohlbrecher D, Herold S, Hock A, Berns K, Park J, Hemmings B, Eilers M (2005) *Akt and 14-3-3eta regulate Miz1 to control cell-cycle arrest after DNA damage. Nat Cell Biol* 7: 30-41.

Webb CP, Vande Woude GF (2000) *Genes that regulate metastasis and angiogenesis. Neurooncol* 50: 71-87.

Wu S, Cetinkaya C, Munoz-Alonso MJ, von der Lehr N, Bahram F, Beuger V, Eilers M, Leon J, Larsson LG (2003) *Myc represses differentiation-induced p21^{CIP1} expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. Oncogene* 22: 351-360.

Yang HY, Shao R, Hung MC, Lee MH (2001) *p27 Kip1 inhibits HER2/neu-mediated cell growth and tumorigenesis. Oncogene* 20: 3695-3702.

Zhang J, Li F, Liu X, Shen L, Liu J, Su J, Zhang W, Deng Y, Wang L, Liu N, Han W, Zhang J, Ji S, Yang A, Han H, Yao L (2006) *The repression of human differentiation-related gene NDRG2 expression by Myc via Miz-1-dependent interaction with the NDRG2 core promoter.* J Biol Chem 281: 39159-39168.

Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T, Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF (1998) *Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization.* Genes Dev 12: 2424-2433.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen, die hier nicht aufgeführt sind, wurden entsprechend den Maßgaben der IUPAC (*International union of pure and applied chemistry*) und denen des SI-Systems (*System Internationale de l'Unité*) verwendet. Spezielle Abkürzungen der Fachtermini, die in dieser Liste nicht enthalten sind, werden jeweils im Text erläutert.

Aqua dest.	destilliertes Wasser
β	beta
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
c	centi
C	Carboxyl
Ca	Kalzium
CdK	Cyclin abhängige Kinase
Cl	Chlor
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
DEPC	Diethyldicarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
cDNS	copy Desoxyribonukleinsäure
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F	Phenylalanin
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HLH	Helix-Loop-Helix-Domäne

k	kilo
LB	Luria-Bertani-Medium
LZ	Leuzin-Zipper
m	mili
Mg	Magnesium
min	Minute
μ	mikro
N	Amino
n	nano
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	Säuregrad
POZ	Poxvirus und Zinkfinger-Domäne
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rt-PCR	Real-Time-quantitative-Polymerase-Kettenreaktion
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
cRNS	copy Ribonukleinsäure
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TE	Tris-EDTA
3'UTR	three prime untranslated region
UV	Ultraviolett
V	Valin
TGF-β	Transforming growth factor β

9.2 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg (in alphabetischer Reihenfolge)

Arnold, Aumüller, Barth, Bartsch, Basler, Baum, Behr, Bertalanffy, Beyer, Bien, Christiansen, Cubayko, Daut, Eilers, Feuser, Fruhstorfer, Gemsa, Geus, Görg, Gotthard, Gotzen, Grimm, Griss, Happle, Hellinger, Hesse, Hofmann, Jungclas, Kern, Klenk, Klose, König, Krieg, Kroll, Lammel, Lang, Langer, Lennartz, Löffler, Maisch, Martin, Moll, Müller, Mutters, Neubauer, Nies, Oertel, Remschmidt, Renz, Richter, Röhrenbeck, Rothmund, Schäfer, Schäfer, Schmidt, Seyberth, Steiniger, Stork, Sundermeyer, Vogelmeier, Vohland, von Wichert, Wagner, Weihe, Welke, Werner, Westermann, Wollmer, Zielke.

9.3 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Eilers für die freundliche Überlassung des interessanten Themas sowie die stetige Beratung und wertvolle Unterstützung, welche für das Gelingen dieser Arbeit ausschlaggebend war.

Vincent Beuger danke ich für die gute Zusammenarbeit, die Ratschläge und den regen Gedankenaustausch.

Mary-Lou Zouzarte danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der fluoreszenzaktivierten Zellanalyse.

Für das gute Arbeitsklima bedanke ich mich bei den Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Eilers, mit denen ich zusammenarbeiten durfte. Danken möchte ich darüber hinaus allen, die mir zur Fertigstellung dieser Arbeit verhalfen.

Ein weiterer Dank gilt meinem Kollegen PD Dr. med. Andres Jan Schrader für die kritische Prüfung des Manuskripts und wertvolle Anmerkungen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern sowie meiner Freundin Francesca Nabari, auf deren Beistand und Unterstützung ich mich zu jeder Zeit verlassen kann.

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

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

„Charakterisierung der Myc-Funktion durch Miz-1 interaktionsdefiziente Myc-Mutanten“

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

Daten aus der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Originalarbeit:

Herold S., Wanzel M., Beuger V., **Frohme C.**, Beul D., Hillukkala T., Syvaoja J., Saluz H. P., Haenel F., and Eilers M. (2002).

Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1.

Mol Cell 10, 509-521.

Kongressbeitrag:

Wanzel M., Beuger V. Herold S., **Frohme C.**, Beul D., Hillukkala T., Syvaoja J., Haenel F., and Eilers M.

Poster: *Regulation of p21Cip1 by Myc and Miz-1*

“Signaling and Cancer”, EMBL/SALK Conference, 20.-23.04.2002, Heidelberg, Deutschland

Marburg, 29.01.2010

Carsten Frohme