



DNA-Bindung von Myc und Miz1 und transkriptionelle Regulation ihrer Zielgene

DNA binding of Myc and Miz1 and transcriptional regulation of their target genes

Dissertation
zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Bereich Biomedizin

Vorgelegt von

Susanne Walz

aus

Gera

Würzburg, Juli 2014

Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Alexander Buchberger

1. Betreuer: Prof. Dr. Martin Eilers

2. Betreuer: Prof. Dr. Stefan Gaubatz

3. Betreuer: Prof. Dr. Dr. Manfred Scharl

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Walz S, Lorenzin F, Morton J, Wiese KE, von Eyss B, Herold S, Rycak L, Dumay-Odelot H, Karim S, Bartkuhn M, Roels F, Wuestefeld T, Fischer M, Teichmann M, Zender L, Wei C-L, Sansom O, Wolf E and Eilers M (2014) Activation and repression by oncogenic Myc shape tumour-specific gene expression profiles. *Nature*, in press.

Wolf E, Gebhardt A, Kawauchi D, Walz S, von Eyss B, Wagner N, Renninger C, Krohne G, Asan E, Roussel MF, Eilers M (2013) Miz1 is required to maintain autophagic flux. *Nat Commun.* **4**: 2535

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Der Transkriptionsfaktor Myc.....	1
1.1.1. Die Myc-Proto-Onkoprotein.....	1
1.1.2. Strukturelle Eigenschaften von Myc.....	1
1.1.3. DNA-Bindung von Myc.....	3
1.1.4. Genomweite Myc-Bindedaten.....	4
1.2. Der Myc-interagierende Transkriptionsfaktor Miz1.....	5
1.2.1. Identifizierung und Struktur.....	5
1.2.2. Funktionen von Miz1.....	6
1.3. Transkriptionelle Regulation durch Myc und Miz1.....	7
1.3.1. Konventionelles Modell der Aktivierung und Repression durch Myc und Miz1.....	7
1.3.2. Modell der generellen Genaktivierung durch Myc.....	11
1.4. Zielsetzung der Arbeit.....	14
2. Material.....	15
2.1. Bakterienstämme und Zelllinien.....	15
2.1.1. Bakterienstämme.....	15
2.1.2. Zelllinien.....	15
2.2. Kultivierungsmedien und Zusätze.....	15
2.2.1. Medien und Antibiotika zur Bakterienkultivierung.....	15
2.2.2. Medien und Zusätze für die Säugerzellkultivierung.....	15
2.3. Nukleinsäuren.....	16
2.3.1. Primer.....	16
2.3.2. Plasmide.....	17
2.4. Antikörper und Peptide.....	18
2.4.1. Primärantikörper.....	18
2.4.2. Sekundärantikörper für Immunoblots.....	19
2.4.3. Peptide für die Elution im reChIP.....	19
2.5. Chemikalien.....	19
2.6. Standards und Enzyme.....	19
2.6.1. Standards.....	19
2.6.2. Enzyme und Kits.....	20
2.7. Puffer und Lösungen.....	20
2.8. Gebrauchsmaterialien.....	25
2.9. Geräte und Membranen.....	25
2.10. Software.....	26
2.11. Online Programme und Datenbanken.....	27
2.12. Verwendete, bereits publizierte Datensätze.....	27
3. Methoden.....	29
3.1. Molekularbiologische Methoden.....	29
3.1.1. Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmidamplifikation.....	29
3.1.2. Herstellen und Auftauen von Bakterienstocks.....	29
3.1.3. Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	29
3.1.4. Messung der Nukleinsäurekonzentration.....	29
3.1.5. Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden.....	30
3.1.6. Radioaktive Markierung und Aufreinigung von DNA Oligonukleotiden.....	30

3.1.7.	Isolation von RNA.....	30
3.1.8.	cDNA-Synthese.....	31
3.1.9.	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR).....	31
3.1.10.	Microarray.....	32
3.2.	Zellbiologische Methoden.....	33
3.2.1.	Auftauen von Zellen.....	33
3.2.2.	Passagieren von Zellen.....	33
3.2.3.	Einfrieren von Zellen.....	33
3.2.4.	Herstellung von Lentiviren.....	34
3.2.5.	Lentivirale Infektion von Säugerzellen.....	34
3.2.6.	Durchflusszytometrie.....	35
3.3.	Proteinbiochemische Methoden.....	35
3.3.1.	Bakterielle Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	35
3.3.2.	Herstellung von Gesamtzell-Proteinlysaten.....	36
3.3.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	36
3.3.4.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
3.3.5.	Nachweis von Proteinen im Polyacrylamid-Gel durch Coomassie-Färbung.....	36
3.3.6.	Immunoblot.....	37
3.3.7.	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (EMSA) und supershift assay.....	37
3.3.8.	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP und reChIP).....	38
3.3.9.	ChIP-Seq.....	40
3.4.	Bioinformatische Analyse von ChIP-Seq-Daten.....	40
3.4.1.	Generierung von <i>peak</i> -Dateien aus ChIP-Seq-Rohdaten.....	40
3.4.2.	Annotierung von <i>peaks</i>	42
3.4.3.	Berechnung von Überschneidungen verschiedener Datensätze.....	42
3.4.4.	Generierung von <i>heat maps</i>	43
3.4.5.	Analyse bekannter Transkriptionsfaktor-Bindemotive.....	43
3.4.6.	<i>de novo</i> -Motivsuche in DNA-Sequenzen.....	43
3.4.7.	Funktionelle Analyse identifizierter Zielgene.....	44
3.5.	Bioinformatische Analyse von Microarray-Daten.....	44
3.5.1.	Auswertung der Rohdaten.....	44
3.5.2.	Generierung von Boxplots.....	44
3.5.3.	Analyse der Übereinstimmung mit Gensets aus Datenbanken.....	44
3.5.4.	Stützvektormethode (SVM-Algorithmus).....	45
3.6.	Statistik.....	45
4.	Ergebnisse.....	46
4.1.	Charakterisierung der Myc- und Miz1-Bindestellen.....	46
4.1.1.	Verifizierung der ChIP-Seq-Datensätze.....	46
4.1.2.	Myc und Miz1 binden gemeinsam an Zielgene.....	51
4.1.3.	Myc und Miz1 binden an RNA-Polymerase II-Promotoren.....	54
4.1.4.	In <i>enhancer</i> -Regionen interagiert Miz1 nicht mit Myc.....	55
4.1.5.	Myc- und Miz1-Bindung an RNA-Polymerase I- und III-transkribierten Genen.....	57
4.1.6.	Max ist Bestandteil des Myc/Miz1-Komplexes.....	59
4.1.7.	Identifizierung eines DNA-Bindemotivs des Miz1-Proteins.....	61
4.1.8.	Das Miz1-Motiv definiert funktionell verschiedene Klassen von Genen.....	73
4.1.9.	Regulation direkt gebundener Gene in B-Lymphozyten.....	74
4.1.10.	Vergleich der Miz1-Bindung in Tumor- und Nicht-Tumorzellen.....	75
4.1.11.	Rekrutierung von Miz1 an Gene mit E-Box.....	76
4.2.	Regulation Myc/Miz1-gebundener Gene.....	78
4.2.1.	Aktivierung durch Myc.....	79
4.2.2.	Vergleichende Analyse von Myc-depletierten Zellen mit Myc-abhängigen Tumoren.....	80
4.2.3.	Aktivierung durch Miz1.....	82
4.2.4.	Myc/Miz1-abhängige Repression.....	82

5. Diskussion	86
5.1. Charakterisierung der Myc- und Miz1-Bindestellen in einer humanen Tumorzelllinie	86
5.1.1. Vergleich mit publizierten ChIP-Seq-Daten und bekannten Myc- und Miz1-Zielgenen...	86
5.1.2. Myc bindet an Zielgene aller drei RNA-Polymerasen.....	87
5.1.3. Bildung eines heterotrimeren Myc/Max/Miz1-Komplexes	88
5.2. Regulation von Myc/Miz1-Zielgenen.....	93
5.2.1. Modell der generellen Genaktivierung durch Myc	99
6. Zusammenfassung	103
6.1. Deutsche Zusammenfassung	103
6.2. English Summary	104
7. Literaturverzeichnis	105
8. Anhang	119
8.1. Abkürzungsverzeichnis.....	119
8.2. In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide	123
8.3. Danksagung.....	129
8.4. Ehrenwörtliche Erklärung.....	130
8.5. Lebenslauf	131

1. Einleitung

1.1. Der Transkriptionsfaktor Myc

1.1.1. Die Myc-Proto-Onkoprotein

Proto-Onkogene werden auf Grund von Veränderungen der DNA-Sequenz zu Onkogenen. Diese Veränderungen können Punktmutationen der kodierenden Sequenz sein oder Amplifikationen und Translokationen größerer genomischer Bereiche. Die erhöhte Expression eines Onkoproteins führt zu einem gesteigerten Zellwachstum und Zellteilungsrate. Eine Reihe humaner Tumore, z. B. Kolonkazinome, Medullo- und Neuroblastome, sind durch eine Amplifikation von *MYC* oder *MYCN* charakterisiert (Brodeur et al, 1984; Alitalo et al, 1983; Kohl et al, 1983; Collins & Groudine, 1982). Burkitt-Lymphome entstehen aufgrund einer Translokation des *MYC*-Locus von Chromosom 8 in den *enhancer*-Bereich der schweren Immunglobulinkette auf Chromosom 14 (Taub et al, 1982; Dalla-Favera et al, 1982). Diese genetischen Veränderungen resultieren in einer gesteigerten Myc-Expression, dadurch kommt es zur Entstehung von Tumoren. Das Protein Myc wurde zuerst als Auslöser der Myelozytomatose (*myelocytomatosis*, eine aviäre Leukämie) identifiziert (Sheiness et al, 1978) und später auch in humanen Zellen nachgewiesen (Vennstrom et al, 1982). Man weiß heute, dass etwa 50 % aller humanen Tumore eine erhöhte Expression von Myc aufweisen (Vita & Henriksson, 2006). Myc ist in allen Vertebraten hochkonserviert (Watson et al, 1983) und findet sich auch in *Drosophila melanogaster* (Gallant et al, 1996). Die Familie der humanen Myc-Proteine umfasst c-Myc (zelluläres Myc), N-Myc (aus Neuroblastomzellen) und L-Myc (aus Lungenkarzinomzellen). c-Myc (im Folgenden bezeichnet als Myc) ist das bisher am besten charakterisierte Mitglied der Myc-Familie und wird in den nachfolgenden Abschnitten näher beschrieben.

1.1.2. Strukturelle Eigenschaften von Myc

Das Myc-Protein enthält mehrere konservierte Domänen, denen spezifische Funktionen zugeordnet werden können (Abb. 1.1). Im unstrukturierten N-terminalen Bereich befindet sich eine Region, die für die Transaktivierung nötig ist sowie die Myc-Boxen I und II. Diese beiden Myc-Boxen sind essentiell für die Transformation von Rat1-Zellen (Stone et al, 1987). Außerdem befinden sich in der Myc-Box I zwei Phosphorylierungsstellen (Threonin 58 und Serin 62), die für die Stabilität des Myc-Proteins von Bedeutung sind (Sears et al, 2000). Die Myc-Box II vermittelt die Interaktion mit transkriptionellen Koaktivatoren wie den Trrap-Komplex (McMahon et al, 2000), der als katalytische Untereinheit die

Histonacetyltransferase Gcn5 enthält. Durch eine Acetylierung von Histonen kommt es zu einer lokal besser für Transkriptionsfaktoren zugänglichen Chromatinstruktur und somit zur transkriptionellen Aktivierung. Eine weitere Histonacetyltransferase, die im Trrap-Komplex rekrutiert wird, ist Tip60, welches präferentiell das Histon H4 acetyliert und so beispielsweise zur Aktivierung des Cyclin D2-Promoters führt (Frank et al, 2003; Bouchard et al, 2001). Zwei weitere Bestandteile des Trrap-Komplexes, Tip48 und Tip49, binden *in vivo* an Myc und besitzen ATPase/Helikase-Aktivität. Dadurch erhalten sie die Fähigkeit zur Chromatin-Remodellierung und daraus resultierender Genaktivierung (Etard et al, 2005; Wood et al, 2000). Im zentralen Bereich des Myc-Proteins befindet sich eine PEST-Domäne (Prolin-Glutaminsäure-Serin-Threonin-reiche Domäne), sowie die Myc-Boxen III und IV. Dieser Bereich des Myc-Proteins ist essentiell für die Interaktion mit Smad2 und 3 (Feng et al, 2002), welche für die Miz1-abhängige transkriptionelle Aktivierung wichtig sind (Seoane et al, 2001; siehe Abschnitt 1.3.1.2). Die Myc-Boxen III und IV sind ebenfalls essentiell für die Transformation von Rat1-Zellen. Der C-terminale Bereich von Myc enthält eine basische Region (BR), welche für die sequenzspezifische DNA-Interaktion nötig ist (Pendergast et al, 1991). Im Anschluss an die basische Region befindet sich eine Helix-loop-Helix-Leucin-Zipper-Domäne (HLH-LZ), die aufgrund ihrer α -helikalen Struktur eine Protein-Protein-Interaktionsfläche darstellt. Es konnte gezeigt werden, dass diese Domäne sowohl zur Bildung von Homodimeren (Dang et al, 1989) als auch zur Heterodimerisierung mit dem Myc-Partnerprotein Max (*Myc-associated factor X*) dient (Blackwood & Eisenman, 1991). Außerdem ist die HLH-LZ-Domäne für die Interaktion mit dem Myc-interagierenden Zinkfingerprotein Miz1 nötig (Peukert et al, 1997).

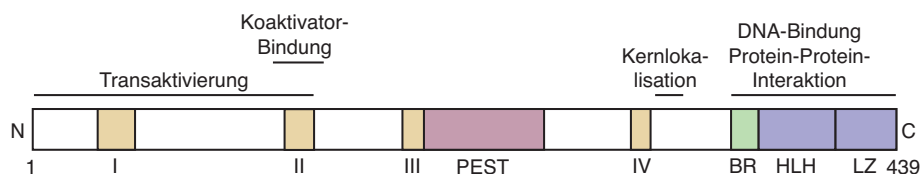


Abb. 1.1: Domänenstruktur des Transkriptionsfaktors Myc.

Schematische Darstellung des humanen Myc-Proteins (439 Aminosäuren). Es enthält eine N-terminalen Bereich, welcher für die Transaktivierung und die Interaktion mit Koaktivatoren nötig ist, sowie 4 Myc-Boxen (I-IV). C-terminal befinden sich eine basische Region (BR), die die DNA-Interaktion vermittelt und ein Helix-loop-Helix-Leucin-Zipper (HLH-LZ) welche als Interaktionsfläche für Max und Miz1 dient. Modifiziert von (Conacci-Sorrell et al, 2014).

1.1.3. DNA-Bindung von Myc

Wie bereits beschrieben, enthält Myc im C-terminalen Bereich eine basische Region zur Etablierung einer Protein-DNA-Interaktion. Diese Interaktion erfolgt meist über eine palindromische DNA-Sequenz (CACGTG), die als Konsensus-E-Box (*enhancer-Box*) bezeichnet wird (Blackwell et al, 1990). Allerdings kann Myc auch mit geringerer Affinität an Nicht-Konsensus-E-Boxen (CANNTG) binden (Blackwell et al, 1993). Ein weiteres Element, das die DNA-Bindung von Myc beeinflusst, sind CpG-Inseln (nicht-methylierte CpG-Dinukleotide): es konnte gezeigt werden, dass CpG-Inseln in Promotoren mit E-Boxen und Myc-Bindestellen stark angereichert sind (Fernandez et al, 2003). Neben diesen E-Box-abhängigen Myc-DNA-Interaktionen sind auch E-Box-unabhängige Myc-Bindungen bekannt. In Chromatin-Immünpräzipitationsexperimenten (ChIP) in P493-6-B-Lymphozyten waren 104 von 654 (16 %) getesteten genomischen Regionen in Promotoren Myc-gebunden, besaßen aber keine E-Box-Sequenzen (Fernandez et al, 2003). Durch die Entwicklung von Hochdurchsatzsequenzierern ist es möglich, immunpräzipitierte DNA eines ChIP-Experiments zu sequenzieren (ChIP-Seq) und anschließend bioinformatisch anhand eines Referenzgenoms zusammenzufügen. Dadurch kann die Bindung eines Proteins an die DNA genomweit abgebildet werden. In ChIP-Seq-Studien haben 45-74 % der Myc-Bindestellen kein bekanntes DNA-Bindemotiv (Seitz et al, 2011; Kuznetsov et al, 2010; Zeller et al, 2006). Eine unerwartete physiologische Relevanz dieser E-Box-unabhängigen Bindestellen wurde von Uribealzo in undifferenzierten HL60-Leukämiezellen gezeigt: das Myc/Max-Heterodimer reprimiert E-Box-unabhängig zusammen mit RAR α (*retinoic acid receptor α*) Gene, die für die Differenzierung nötig sind und wirkt so tumorsuppressiv (Uribealzo et al., 2011).

Neben der DNA-Bindesequenz ist es ebenfalls von Bedeutung, in welchen genomischen Bereichen Myc bindet. Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der im Kernpromoter von RNA-Polymerase II-transkribierten Genen bindet und die Genexpression reguliert. Neben der Bindung in Promoterbereichen ist ebenfalls bekannt, dass Myc in *enhancer*-Regionen bindet. *Enhancer* sind DNA-Bereiche „offenen“ Chromatins, welche zum Teil mehrer Kilobasen entfernt sind von der Transkriptionsstartstelle (TSS) eines Gens, und an die Transkriptionsfaktoren binden können, die die Genexpression aktivieren. Die Bindung von Myc in *enhancer*-Bereichen konnte für einzelne Gene wie Prothymosin α (Gaubatz et al, 1994), aber auch genomweit mittels ChIP-Seq-Experimenten in P493-6-B-Lymphozyten (Lin et al, 2012), gezeigt werden.

Weiterhin bindet und reguliert Myc von RNA-Polymerase III-transkribierte Gene. RNA-Polymerase III transkribiert tRNA-Gene sowie die 5S-rRNA und einige kleine RNAs (ncRNAs). Myc bindet an Promotoren RNA-Polymerase III-transkribierter Gene und aktiviert

deren Expression (Gomez-Roman et al, 2003; Felton-Edkins et al, 2003). Myc hat einen stimulierenden Einfluss auf die Proteinbiosynthese, da viele Myc-Zielgene für ribosomale Proteine und Translationsfaktoren kodieren. Diese transkriptionelle Aktivität ist konsistent mit der Myc-abhängigen transkriptionellen Regulation von tRNAs. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass für die Transformation von Zellen und die Tumorgenese abhängig ist von der durch Myc aktivierten Transkription von RNA-Polymerase III-Genen. Eine Myc-vermittelte transkriptionelle Aktivierung von RNA-Polymerase III-Genen führte im Mausmodell zu zellverankerungsunabhängigem Wachstum von embryonalen Fibroblasten und zur Tumorentstehung (Johnson et al, 2008).

RNA-Polymerase I transkribiert die 45S prä-rRNA, welche im Genom an verschiedenen Loci in mehreren Wiederholungen kodiert wird. Die prä-rRNA wird im Verlauf der Prozessierung in die drei rRNAs 18S, 5,8S und 28S geschnitten. Nach Aktivierung von Myc in NIH3T3-Fibroblasten steigt die 45S prä-rRNA-Menge um das 2- bis 3-fache (Poortinga et al, 2004). Auch in HeLa-Zervixkarzinomzellen und P493-6-B-Lymphozyten nach Myc-Induktion konnte eine Bindung an rRNA-Loci und eine gesteigerte Transkription beobachtet werden (Grandori et al, 2005; Arabi et al, 2005). Ähnliches wurde auch für Myc in *D. melanogaster* gezeigt (Grewal et al, 2005). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Myc meist sequenzspezifisch DNA bindet und an der Expression von Transkripten aller drei RNA-Polymerasen beteiligt ist.

1.1.4. Genomweite Myc-Bindedaten

Mit der Entwicklung der ChIP-Seq-Technologie (Chromatin-Immunpräzipitation gefolgt von Hochdurchsatzsequenzierung) konnten in den letzten Jahren genomweite Bindedaten für Transkriptionfaktoren, modifizierte Histone und anderer DNA-interagierender Proteine gewonnen werden. Myc ist auf Grund seiner Funktion als Onkoprotein von besonderem Interesse. Dementsprechend wurden bisher über 20 Myc-ChIP-Seq-Datensätze aus verschiedenen humanen Zelllinien publiziert (Tab. 1.1). Diese Datensätze wurden aus Zellen von unterschiedlichen Tumoren, Zelllinien und normalem Gewebe (Spalte 2) generiert. Die Anzahl der gefundenen Myc-Bindestellen ist dabei sehr variabel (Spalte 3). Dies liegt zum einen an der zunehmenden Sequenziertiefe und somit der Zunahme der Sensitivität der Sequenzierung, und zum anderen an der unterschiedlichen bioinformatischen Auswertung in den verschiedenen Publikationen. Des Weiteren unterscheiden sich Myc-Proteinmengen in verschiedenen Zelllinien oftmals erheblich. Neben publizierten und ausgewerteten Datensätzen stehen mehrere Myc-Datensätze des ENCODE-Konsortiums (*Encyclopedia of*

DNA elements) zur Verfügung. Dieses Konsortium generiert unter anderem ChIP-Seq-Datensätze und stellt Rohdaten zur Weiterverwendung bereit.

Zelllinie	Herkunft	Myc-Bindestellen	Referenz
P493-6	Burkitt-Lymphom	4.296	Zeller et al, 2006
K562	Chronische myeloische Leukämie	22.728	Raha et al, 2010
Raji	Burkitt-Lymphom	8.325	Seitz et al, 2011
CA46	Burkitt-Lymphom	3.786	Seitz et al, 2011
Blue1	Burkitt-Lymphom	7.683	Seitz et al, 2011
BL41	Burkitt-Lymphom	15.053	Seitz et al, 2011
Ramos	Burkitt-Lymphom	8.129	Seitz et al, 2011
P493-6	Burkitt-Lymphom	14.753	Lin et al, 2012
LoVo	Kolorektales Adenokarzinom	35.623	Yan et al, 2013
MDA-MB453	Mammakarzinom	9.375	Ni et al, 2013
HeLa	Zervixkarzinom	NV	ENCODE
MCF10A	Normales Brustepithel	NV	ENCODE
MCF7	Mammakarzinom	NV	ENCODE
hESC	Embryonale Stammzellen	NV	ENCODE
NB4	Akute myeloische Leukämie	NV	ENCODE
A549	Lungenkarzinom	NV	ENCODE
GM12878	B-Lymphozyten	NV	ENCODE
HUVEC	Normale Umbellicalvenenzellen	NV	ENCODE
HepG2	Hepatozelluläres Karzinom	NV	ENCODE
FB0167P	Progerie (Fibroblasten)	NV	ENCODE
FB8470	Normale Fibroblasten	NV	ENCODE
H54	Glioblastom	NV	ENCODE
NHEK	Normale Keratinozyten	NV	ENCODE

Tab. 1.1: Publierte Myc-ChIP-Seq-Datensätze in humanen Zelllinien.

Auflistung der zum Zeitpunkt dieser Arbeit vorhandenen Myc-ChIP-Seq-Datensätze aus verschiedenen humanen Zellsystemen. Datensätze des ENCODE-Projekts werden als Rohdaten zur Verfügung gestellt und beinhalten deshalb keine annotierten Bindestellen (NV: nicht vorhanden). Die Anzahl der Myc-Bindestellen der anderen Datensätze wurden direkt aus den angegebenen Publikationen entnommen.

1.2. Der Myc-interagierende Transkriptionsfaktor Miz1

1.2.1. Identifizierung und Struktur

Der Transkriptionsfaktor Miz1 (*Myc-interacting zinc finger protein 1*) wurde in einem *yeast-two-hybrid*-Experiment als Myc-interagierendes Protein identifiziert (Peukert et al, 1997). Hierbei interagierte die C-terminale HLH-LZ-Region von Myc mit dem C-terminalen Bereich von Miz1. In diesem C-terminalen Bereich befinden sich 13 Zinkfinger (Abb. 1.2) vom Typ C₂H₂. Diese Zinkfinger bilden α -helikale Bereiche wobei je zwei Cystein- und Histidin-Reste ein Zink-Ion komplexieren. Sie vermitteln Interaktionen mit DNA und Proteinen. Für die

Interaktion von Miz1 mit Myc ist ein Bereich zwischen den Zinkfingern 12 und 13, der ebenfalls die Fähigkeit besitzt, α -helikale Bereiche auszubilden, essentiell (Peukert et al, 1997). Des Weiteren sind die Zinkfinger 1-4 für die Wechselwirkung mit Smad-Proteinen nötig (Seoane et al, 2001). N-terminal befindet sich eine BTB/POZ-Domäne (*poxvirus and zinc finger/bric-à-brac, tramtrack and broad complex*). Die BTB/POZ-Domäne wurde im N-Terminus von Zinkfingerproteinen gefunden und ermöglicht durch die Ausbildung hydrophober Flächen die Interaktion mit anderen Proteinen (Bardwell & Treisman, 1994; Albagli et al, 1995). Im Miz1-Protein ist die BTB/POZ-Domäne für die Homotetramerisierung verantwortlich ist (Stead et al, 2007). Außerdem ist diese Domäne nötig für die inhibitorische Funktion von Miz1 auf die Genexpression (Peukert et al, 1997).

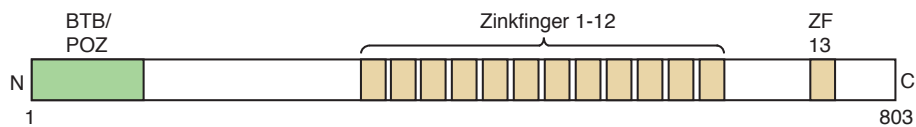


Abb. 1.2: Domänenstruktur des Myc-interagierenden Zinkfingerproteins Miz1.

Schematische Darstellung des Transkriptionsfaktors Miz1 (803 Aminosäuren). N-terminal befindet sich eine BTB/POZ-Domäne welche zur Tetramerisierung nötig ist und repressive Aktivität besitzt. Im C-Terminus befinden sich 13 Zinkfinger, welche Interaktionen mit anderen Proteinen (z. B. Myc, Smad3/4) und DNA vermitteln. ZF: Zinkfinger, N: N-Terminus, C: C-Terminus.

1.2.2. Funktionen von Miz1

Als Transkriptionsfaktor bindet Miz1 an DNA. Im *CDKN2B*-Promoter ($p15^{\text{Ink4B}}$) findet die DNA-Bindung in der Initiator-Region an der transkriptionellen Startstelle statt (Staller et al, 2001). Der Initiator ist ein schwach konserviertes Motiv mit der Konsensus-Sequenz $YYCA_{+1}YYYYY$, wobei die Position A_{+1} die Startstelle der Transkription angibt. Ein exaktes Konsensusmotiv für die DNA-Bindesequenz von Miz1 ist bislang nicht bekannt.

Miz1 konnte bisher verschiedene Funktionen zugeordnet werden. Für die embryonale Entwicklung ist es essentiell, da *Miz1*^{-/-}-Mäuse am Tag 7,5 in der embryonalen Entwicklung sterben, weil die Gastrulation ausbleibt (Adhikary et al, 2003). Außerdem zeigt ein konditionaler *Miz1* Δ POZ-*knockout* in Keratinozyten Veränderungen der Haarfollikel und aufgrund der Miz1-abhängigen Zellzykluskontrolle eine Änderung des Haarzyklus (Gebhardt et al, 2007). Ein konditionaler *Miz1* Δ POZ-*knockout* in neuronalen Zellen führt zu gestörter Autophagozytose und zerebraler Neurodegeneration bei Mäusen (Wolf et al, 2013).

Neben diesen Funktionen hat Miz1 auch Aufgaben in verschiedenen zellulären Prozessen. So ist beispielsweise das Zellwachstum über einen Rückkopplungsmechanismus über Nucleophosmin (Npm1), dem ribosomalen Protein L23 (Rpl23) und Miz1 an den Zellzyklusverlauf gekoppelt (Wanzel et al, 2008). Liegt Npm1 im Zellkern vor, bildet es einen Komplex mit Miz1 und führt zur transkriptionellen Aktivierung von Zellzyklusinhibitoren wie p15^{Ink4B}. In Rat1-Zellen induziert eine Überexpression von Miz1 einen G1-Arrest im Zellzyklus durch eine erhöhte Expression von p15^{Ink4B} (Staller et al, 2001). Das Gen des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1} (*CDKN1A*) ist ebenfalls ein Miz1-Zielgen (Seoane et al, 2002) und spielt eine Rolle in der Tumorentstehung in murinen Keratinozyten (Honnemann et al, 2012). Des Weiteren sind Proteine der extrazellulären Matrix, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsproteine Zielgene von Miz1 (Gebhardt et al, 2006; Herkert et al, 2010). Die Myc/Miz1-abhängige Repression dieser Gene könnte zu einer gesteigerten Invasivität von Tumoren führen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Miz1 nötig ist für die Myc-abhängige Apoptose (Patel & McMahon, 2006), indem es Arf-abhängig sumoyliert wird und Zielgene reprimiert werden (Herkert et al, 2010). Dadurch hat Miz1 eine tumorsuppressive Wirkung.

Außer der Funktion als Transkriptionsfaktor hat Miz1 auch transkriptionsunabhängige Aufgaben. So inhibiert Miz1 die Huwe1-vermittelte Ubiquitinierung von Myc, welche für die Transaktivierung von Myc-Zielgenen essentiell ist (Adhikary et al, 2005).

1.3. Transkriptionelle Regulation durch Myc und Miz1

1.3.1. Konventionelles Modell der Aktivierung und Repression durch Myc und Miz1

1.3.1.1. Transkriptionelle Aktivierung durch Myc

Wie aus den ChIP-Seq-Datensätzen (siehe Abschnitt 1.1.4) bereits ersichtlich ist, hat Myc tausende Bindestellen im humanen Genom. Man geht davon aus, dass etwa 15 % aller humanen Gene durch Myc reguliert werden (Dang et al, 2006; Li et al, 2003). Diese Gene sind an vielen zellulären Prozessen wie Translation, Metabolismus, Zellwachstum, Zellzyklusregulation, RNA-Metabolismus und Signaltransduktion beteiligt (Dang et al, 2006). Viele dieser Gene enthalten E-Boxen und werden durch Myc aktiviert. Für die transkriptionelle Aktivierung ist die Bindung des Myc-Partnerproteins Max im Bereich der basischen HLH-LZ-Region nötig. Dieses Heterodimer bindet an DNA und rekrutiert verschiedene Koaktivatorkomplexe (Abb. 1.3). Die Koaktivatorkomplexe enthalten als katalytische Untereinheiten Histonacetyltransferasen (HATs), welche die Histone H3 und H4 an N-terminalen Lysinresten acetylieren. Dies führt zu einer verminderten Interaktion von

DNA mit Histonen und somit zu einer „offeneren“ Chromatinstruktur, welche einfacher zugänglich ist für die Transkriptionsmaschinerie. Trrap interagiert mit einem N-terminalen Bereich von Myc (Park et al, 2001) und bildet unter anderem einen Komplex mit Gcn5, welches Histon H3-HAT-Aktivität besitzt. Trrap rekrutiert Gcn5 zu Myc und führt so zu einer Genaktivierung (McMahon et al, 1998; McMahon et al, 2000). Auch die Aktivierung von RNA-Polymerase III-Genen ist abhängig von der Acetylierung von Histon H3 durch Trrap/Gcn5 (Kenneth et al, 2007). Ein weiterer HAT-Komplex ist Trrap/Tip60, welcher ebenfalls von Myc an Chromatin rekrutiert wird und präferenziell Lysinreste am Histon H4 acetyliert (Frank et al, 2003; Bouchard et al, 2001). Des Weiteren wird die Transkription des *TERT*-Gens durch die Myc-abhängige Rekrutierung der Histonacetyltransferase p300 aktiviert (Faiola et al, 2005).

Neben der HAT-abhängigen Aktivierung der Transkription gibt es weitere Mechanismen der Myc-abhängigen Transaktivierung (Bouchard et al, 2004; Eberhardy et al, 2000). Beispielsweise rekrutiert Myc am Cyclin D2-Promoter den Mediator-Komplex, TFIIF und P-Tefb (*positive transcription elongation factor b*). Der Mediator-Komplex hat keine enzymatische Funktion, hilft aber bei der Rekrutierung von Elongationsfaktoren der RNA-Polymerase II. TFIIF ist ein Proteinkomplex mit Cdk7 als enzymatischer Komponente und sorgt für die Phosphorylierung der Serin 5-Reste der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II (Lu et al, 1992). Infolgedessen initiiert die RNA-Polymerase II die Transkription und mRNA wird synthetisiert. P-Tefb enthält als enzymatische Untereinheit Cdk9 und ist nötig für die Serin 2-Phosphorylierung der RNA-Polymerase II-CTD (Ramanathan et al, 2001). Dadurch ist eine Elongation über die ersten Basenpaare hinweg möglich. Alle diese durch Myc rekrutierten Faktoren wirken direkt auf die Aktivität der RNA-Polymerase II und ermöglichen so eine transkriptionelle Genaktivierung.

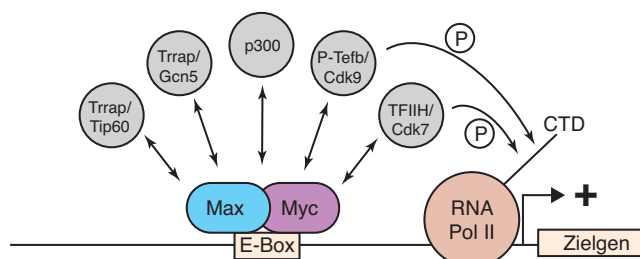


Abb. 1.3: Transkriptionelle Genaktivierung durch Myc.

Die Myc-abhängige Aktivierung von Zielgenen, beteiligt beispielsweise an Proteinbiosynthese, Metabolismus und Zellzyklusregulation, wird zum einen durch den Kontakt zu Koaktivatorcomplexen vermittelt. Zum anderen rekrutiert Myc Proteine, die für die Initiation und Elongation der RNA-Polymerase II nötig sind. CTD: C-terminale Domäne, Pol: Polymerase, P: Phosphorylierung.

1.3.1.2. Transkriptionelle Aktivierung durch Miz1

Die transkriptionelle Regulation durch Miz1 konnte für Zellzyklusinhibitoren wie p57^{Kip2}, p21^{Cip1} und p15^{Ink4B} (Adhikary et al, 2003; Seoane et al, 2002; Seoane et al, 2001; Staller et al, 2001) sowie für verschiedene Gene kodierend für Adhäsionsproteine gezeigt werden. Detailliert ist die Regulation von p15^{Ink4B} untersucht. p15^{Ink4B} interagiert mit Cdk4 und Cdk6, welche im Komplex mit Cyclin D vorliegen, und verhindert so das Durchlaufen der frühen und mittleren G1-Phase des Zellzyklus (Hannon & Beach, 1994). p15^{Ink4B}-überexprimierende Zellen sind somit in der G1-Phase arretiert. Außerdem ist bekannt, dass p15^{Ink4B} durch Tgf β (*transforming growth factor β*) aktiviert werden kann (Sandhu et al, 1997; Reynisdottir et al, 1995). Für die transkriptionelle Aktivierung von p15^{Ink4B} ist Miz1 nötig (Abb. 1.4), welches in der Initiator-Region in der Nähe des Transkriptionsstarts an die DNA bindet (Staller et al, 2001). Außerdem ist die Interaktion von Miz1 mit Smad3 (*SMAD family member 3*), welches durch Tgf β induziert wird, nötig für eine p15^{Ink4B}-Genaktivierung (Seoane et al, 2001). Des Weiteren wird Miz1 benötigt, um den p300-Koaktivator-Komplex, eine Histonacetyltransferase zu rekrutieren (Seoane et al, 2001).

Ein Tgf β -unabhängiger Mechanismus der p15^{Ink4B}-Aktivierung durch Miz1 verknüpft Zellwachstum mit dem Fortschreiten des Zellzyklus (Wanzel et al, 2008). Rpl23 ist ein Myc-Zielgen und befindet sich im Nukleolus. Dort bindet es an Npm1 und hält dieses so im Nukleolus. Bei niedrigen Rpl23-Proteinmengen gelangt ungebundenes Npm1 in den Kern und interagiert mit Miz1, wodurch Zellzyklusinhibitoren transkriptionell aktiviert werden. Auf diese Weise wird das Zellwachstum, bestimmt durch die Expression von Myc-Zielgenen, mittels eines Rückkopplungsmechanismus an die Progression im Zellzyklus gekoppelt.

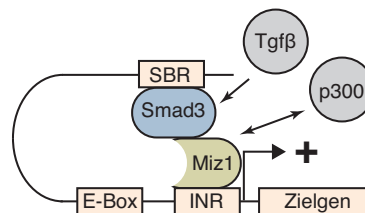


Abb. 1.4: Transkriptionelle Genaktivierung durch Miz1.

Miz1-abhängige Aktivierung von Zellzyklusinhibitoren wie p15^{Ink4B}. Durch Tgf β -induzierte Smad-Proteine, welche an SRB-Sequenzen (*Smad-binding region*) binden, sind nötig für die Genaktivierung. INR: Initiator-Element.

1.3.1.3. Myc-abhängige Repression

Die Myc-abhängige Genrepression von Zellzyklusinhibitoren und Zelladhäsionsproteinen stellt eine wichtige Funktion bei der Transformation von Zellen dar. Durch die Repression von p21^{Cip1}, p15^{Ink4B}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2} wird die Regulation der Zellzyklusphasen gestört und Zellen beginnen zu proliferieren. Für die transkriptionelle Repression dieser Gene ist ein heterotrimerer Myc/Max/Miz1-Komplex nötig (Staller et al, 2001; Abb. 1.5). Dabei inhibiert Myc die Bindung von p300 an Miz1 wodurch eine Öffnung der Chromatinstruktur unterbleibt. Auch für das Myc-Zielgen *c/EBPβ* konnte ein ähnlicher Mechanismus für die Myc-abhängige Repression gezeigt werden (Steinmann et al, 2009). Daneben sind weitere Korepressoren bekannt, die durch Myc/Max/Miz1 an Zielgene rekrutiert werden. Die DNA-Methyltransferase Dnmt3a wird an den p21^{Cip1}-Promoter rekrutiert und methyliert Cytosine der DNA (Brenner et al, 2005). Auch rekrutiert Myc mit Hilfe der Myc-Box III die Histondeacetylase Hdac3 und reprimiert auf diese Weise die Gene *ID2* und *GADD153* (Kurland & Tansey, 2008). Die Abhängigkeit der Repression von Miz1 konnte mit einer Punktmutante von Myc, MycV394D, *in vitro* und *in vivo* belegt werden (van Riggelen et al, 2010; Gebhardt et al, 2006). Diese Mutante bindet zwar noch an Max und kann Gene aktivieren, die Interaktion mit Miz1 und somit die transkriptionelle Repression ist allerdings nicht mehr möglich (Herold et al, 2002).

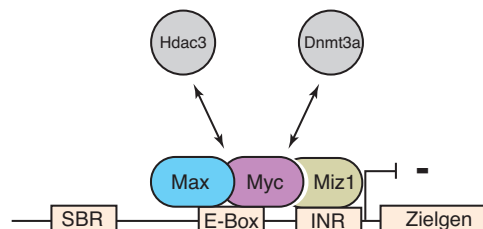


Abb. 1.5: Transkriptionelle Repression durch einen Myc/Max/Miz1-Komplexes.

Ohne Tgfβ-Aktivität bildet sich kein aktivierender Miz1/Smad-Komplex, sondern ein heterotrimerer Myc/Max/Miz1-Komplex, der mittels Rekrutierung von Korepressoren zu einer „geschlossenen“ Chromatinstruktur führt. SBR: *Smad-binding region*, INR: Initiator-Sequenz.

Neben dem Myc/Max/Miz1-Komplex gibt es weiter Miz1-, beziehungsweise Myc-enthaltende Komplexe, die eine Repression vermitteln können. Die Zellzyklusinhibitoren p15^{Ink4B} und p21^{Cip1} werden in humanen Leukämiezelllinien Tgfβ-abhängig von einem trimeren Myc/Miz1/Gfi1-Komplex reprimiert (Liu et al, 2010; Basu et al, 2009). Gfi1 ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der als transkriptioneller Repressor in hämatopoetischen Zellen identifiziert wurde und eine Rolle bei der Entstehung von Lymphomen spielt. Die durch Gfi1 vermittelte Repression ist nicht von der DNA-Bindung von Gfi1 abhängig, wodurch

angenommen wird, dass der repressorische Effekt auf die Genrepression von Miz1 vermittelt wird.

Des Weiteren bildet Myc, unabhängig von Miz1, einen repressiven Komplex mit Sp1 (*specificity protein 1*), einem weiteren Zinkfinger-Transkriptionsfaktor. Dies konnte für den p21^{Cip1}-Promoter in einer Kolonkarzinomzelllinie gezeigt werden (Gartel et al, 2001). Auch ist bekannt, dass ein N-Myc-Sp1-Komplex mittels Rekrutierung von Hdac2 zu einer Repression des Cyclin G2-Gens führt (Marshall et al, 2010). Außerdem reprimiert der Myc-Sp1-Komplex BAG2, welches für ein Protein kodiert, das die Ubiquitin-abhängige Proteindegradation inhibiert (Zhang et al, 2012).

Bcl6, bzw. Zbtb4 bilden ebenfalls Protein-Protein-Komplexe mit Miz1 und führen so zu einer Myc-unabhängige Repression von Miz1-Zielgenen. Bcl6 ist ein Proto-Onkoprotein, das als transkriptioneller Repressor mit der Entstehung von Nicht-Hodgkin-Lymphomen in Verbindung gebracht wird. Ein Zielgen für die transkriptionelle Repression durch den Bcl6/Miz1-Komplex ist p21^{Cip1}, wodurch eine starke Proliferation von B-Lymphozyten und somit die Transformation ermöglicht wird (Phan et al, 2005). Während der Reifung von B-Lymphozyten reprimiert der Bcl6/Miz1-Komplex ebenfalls Bcl2, ein anti-apoptotisches Protein (Saito et al, 2009). In einem Drittel von diffusen, großzelligen B-Zelllymphomen kommt es zu Translokationen des *BCL2*-Genlocus, was zu einer gesteigerten Expression von Bcl2 führt. Liegt keine Translokation vor, ist die Miz1-Expression häufig erhöht, wodurch die Bcl6-vermittelte Repression von Bcl2 nicht zustande kommt. Durch hohe Miz1-Mengen entstehen neben reprimierenden Bcl6/Miz1-Komplexen auch Bcl6-freie Miz1-Proteine, die die Expression von Bcl2 aktivieren können (Kosan et al, 2010; Saito et al, 2009). In einen weiteren Myc-unabhängigen Repressionsmechanismus ist das BTB/POZ-Zinkfingerprotein Zbtb4 involviert (Weber et al, 2008). Dieses bildet einen heterodimeren Komplex mit Miz1 und reprimiert mittels mSin3/HDAC-Rekrutierung die Expression von p21^{Cip1}.

1.3.2. Modell der generellen Genaktivierung durch Myc

Neben den bisher beschriebenen Mechanismen zur transkriptionellen Regulation von spezifischen Zielgenen durch Myc und Miz1 wurde auch eine generelle Genaktivierung durch Myc beschrieben. Es ist bekannt, dass Myc einen Einfluss auf die gesamte Chromatinstruktur einer Zelle hat (Knoepfler et al, 2006): mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen von neuronalen Vorläuferzellen aus konditionalen N-Myc-*knockout*-Mäusen konnte eine starke Abnahme der Acetylierung von Histon H3 und H4

sowie die Trimethylierung von H3K4 nachgewiesen werden. Des Weiteren nimmt die Di- und -Trimethylierung des Lysin-9-Rests des Histons H3 zu. Diese Änderungen von Histonmodifikationen führen zu einer „geschlossenen“, für Transkriptionsfaktoren schlechter zugänglichen Chromatinstruktur nach dem Verlust von Myc. Daraus resultierend wurde vorgeschlagen, dass Myc einen direkten Einfluss auf die Rekrutierung der Histon-modifizierenden Proteinkomplexe hat, um eine „offene“ Chromatinstruktur zu etablieren und auch einen indirekten Einfluss, da beispielsweise Gcn5 von Myc transkriptionell aktiviert wird.

In primären murinen B- und T-Lymphozyten hat Myc einen globalen Einfluss auf die Genexpression. Naive Lymphozyten benötigen eine Aktivierung um in Plasma- oder Gedächtniszellen differenzieren zu können. Die durch Lipopolysaccharid oder dem Mitogen Concanavalin A stimulierten B- und T-Lymphozyten sind charakterisiert durch ein starkes Zellwachstum und eine Zunahme sowohl von Gesamt-RNA als auch mRNA. Auch wird Myc durch die Stimulation stark induziert (Nie et al, 2012). Mittels Chromatin-Immunpräzipitationen und Microarray-Experimenten wurden die Änderungen der Myc- und RNA-Polymerase II-Besetzung an Promotoren und der Genexpression untersucht. Es zeigte sich, dass die Myc-Bindung in Promotoren RNA-Polymerase II-transkribierter Gene mit der Genaktivierung nach Lymphozyten-Stimulation korreliert. Außerdem führt eine Steigerung der Myc-Bindung zu einer entsprechenden Zunahme von RNA-Polymerase II an allen Promotoren. Darüber hinaus erfolgt eine verstärkte Freisetzung von arretierten RNA-Polymerase II nach Myc-Induktion und einer gesteigerten Elongation durch die RNA-Polymerase II. Dies resultiert in einem Modell, wonach Myc in Lymphozyten durch seine Interaktion mit RNA-Polymerase II-Kofaktoren generell die Transkription aller Gene aktiviert. Die in genomweiten Expressionsanalysen beobachtete Repression durch Myc wird durch das gängige Verfahren der Normalisierung der Expressionsdaten auf die Gesamt-RNA-Menge erklärt. Gene, die weniger stark aktiviert werden als der Durchschnitt aller Gene, werden so als reprimiert identifiziert. Eine Normalisierung der Expression auf die Zellzahl würde allerdings zeigen, dass sie aktiviert werden. Außerdem kann eine indirekte Repression durch die Myc-abhängige Aktivierung von Chromatin-modifizierenden Korepressoren oder transkriptionellen Repressoren erreicht werden.

Der genomweite Einfluss der Interaktion von Myc mit RNA-Polymerase II-Kofaktoren konnte von einer Arbeitsgruppe um R. Young gezeigt werden (Rahl et al, 2010). In embryonalen Stammzellen rekrutiert Myc P-Tefb um eine Serin 2-Phosphorylierung der RNA-Polymerase II-CTD zu fördern. Dadurch wird die promoternahe Pausierung der RNA-Polymerase II, die ein generelles Merkmal der Transkription in Säugerzellen darstellt, überwunden und die Elongation eingeleitet. Diese Myc-abhängige P-Tefb-Rekrutierung

geschieht genomweit in allen aktiv transkribierten Myc-Zielgenen. Allerdings wird in dieser Studie nicht explizit die Konsequenz der P-Tefb-Rekrutierung auf die Genexpression untersucht.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die Expression des Onkoproteins Myc ist in etwa 50 % der humanen Tumore erhöht. Myc reguliert transkriptionell Gene, die für Proliferation, Zellwachstum und Angiogenese essentiell sind. Um neue Tumorthérapien zu entwickeln ist das Verständnis der Inhibition der Myc-Funktionen unerlässlich. Ziel dieser Arbeit ist es, eine bessere Kenntnis der transkriptionellen Regulation und der genomweiten DNA-Bindung von Myc und Miz1 in Tumorzellen zu erhalten.

Zu diesem Zweck wurden in einem ersten Schritt die genomweiten Bindestellen von Myc und Miz1 in HeLa-Zervixkarzinomzellen mit Chromatin-Immunpräzipitationen gefolgt von Hochdurchsatzsequenzierung identifiziert sowie bioinformatisch und biochemisch charakterisiert. Die bioinformatische Auswertung fokussierte sich auf die durch Myc- und Miz1-gebundenen Gene und deren Funktion. Es sollte analysiert werden, wie viele Gene genomweit Zielgene von Myc und Miz1 sind und welchen Gruppen diese Gene zugeordnet werden können. Des Weiteren sollte untersucht werden, welche DNA-Sequenzen die Interaktion der Transkriptionsfaktoren Myc und Miz1 mit DNA vermitteln. Dies ist von Bedeutung, da eine spezifische DNA-Konsensussequenz zwar für Myc, allerdings nicht für Miz1 bekannt ist. Die biochemische Analyse sollte zeigen, ob Myc und Miz1 gemeinsam als Komplex an Zielgene binden und welches Protein im Komplex die DNA-Interaktion herstellt.

Im weiteren Verlauf sollten die Auswirkungen der DNA-Bindung auf die Genexpression untersucht werden. Dazu wurden mittels Microarray-Experimenten genomweite Expressionsdaten gewonnen und mit Myc- und Miz1-Bindedaten korreliert. Hierbei sollte insbesondere geklärt werden, ob das Modell der generellen Genaktivierung durch Myc (Nie et al, 2012) auch in einer Tumorzelllinie verifiziert werden kann. Andernfalls sollte überprüft werden, ob unterschiedliche transkriptionelle Regulation durch unterschiedliches Bindeverhalten von Myc und Miz1 an Zielgenen erklärt werden kann.

2. Material

2.1. Bakterienstämme und Zelllinien

2.1.1. Bakterienstämme

- DH5a *Escherichia coli*; chromosomaler Genotyp: F-, ϕ 80d*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk-, mk+), *phoA*, *supE44*, λ -, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*; verwendet zur Herstellung und Amplifikation von Plasmiden
- XL1blue *Escherichia coli*; chromosomaler Genotyp: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [F' *proAB lac^fZ* Δ M15 Tn10 (Tet^r)]; verwendet zur Amplifikation von Plasmiden auf der Basis von pLKO-Vektoren
- BL21 *Escherichia coli*; chromosomaler Genotyp: B, F-, *dcm*, *ompT*, *hsdS*(rB-mB-), gal [malB⁺]_{K-12}(λ S); verwendet zur Expression von GST-Fusionsproteinen

2.1.2. Zelllinien

- HeLa humane Zervixkarzinomzelllinie (ATCC)
- HEK293T humane embryonale Nierenzelllinie (ATCC)

2.2. Kultivierungsmedien und Zusätze

2.2.1. Medien und Antibiotika zur Bakterienkultivierung

2.2.1.1. Medien

- LB-Medium 1 % (w/v) Baktotrypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
1 % (w/v) NaCl

LB-Agar LB-Medium mit 1,2 % (w/v) Bakto-Agar; nach Erhitzen wurde der LB-Agar auf 50 °C abgekühlt und 20 ml auf eine 10 cm-Schale gegossen.

2.2.1.2. Antibiotikum

Dem LB-Medium oder dem LB-Agar wurde 100 μ g/ml Ampicillin hinzugefügt.

2.2.2. Medien und Zusätze für die Säugerzellkultivierung

2.2.2.1. Medien

Für die Kultivierung der humanen Zelllinien wurden DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Lonza; Sigma) verwendet, das bereits mit 4 mM L-Glutamin und 4,5 g/l Glukose supplementiert war. Dem Medium zugesetztes fötales Kälberserum (*fetal bovine serum*, FBS; Sigma) wurde vor Verwendung hitzeinaktiviert (30 min, 56 °C).

HeLa, HEK293T	DMEM
	10 % (v/v) FBS
	1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml)
Transfektionsmedium	DMEM
	2 % (v/v) FBS
	1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml)
Einfriermedium	DMEM
	35 % (v/v) FBS
	10 % (v/v) DMSO

2.2.2.2. Antibiotika

Zur Selektion von erfolgreich infizierten Zellen wurden diese mit Puromycin (2,5 µg/ml; Invitrogen) oder Hygromycin (200 µg/ml; PAA) behandelt. Zur Behandlung von Mycoplasmen-Kontaminationen in der Säugerzellkultivierung wurde gegebenenfalls Plasmocin (InvivoGen) in der Konzentration von 25 µg/ml verwendet. Die Behandlung erfolgte für 2 Wochen mit zweitägigem Wechsel von Medium und Plasmocin. Zur Vorbeugung vor Mycoplasmen-Kontaminationen wurde den Medien der Stockplatten Ciprofloxacin (Sigma) in einer Konzentration von 10 µg/ml zugegeben.

2.2.2.3. Weitere Zusätze

Cycloheximid (Sigma) 50 µg/ml in Ethanol

Polybren (Sigma) 4 µg/ml

2.3. Nukleinsäuren

2.3.1. Primer

Alle im Abschnitt 8.2. im Anhang gelisteten humanen DNA-Primer (f = *forward*; r = *reverse*) wurden von den Firmen Invitrogen bzw. Operon synthetisiert. Das Primerdesign erfolgte mit

den Programmen Primer3 (für Chromatin-Immunpräzipitation) oder der Universal ProbeLibrary (Roche; für qRT-PCR). Bei Oligonukleotiden für die qRT-PCR musste sichergestellt sein, dass sie Exon-Intron-Grenzen überschritten, damit die Amplifikation von genomischer DNA unterblieb.

2.3.2. Plasmide

2.3.2.1. Leervektoren

pGEX4T1	bakterieller Expressionsvektor mit einem tac-Promotor zur IPTG-induzierbaren Expression von GST-Fusionsproteinen (GE Healthcare)
pLKO	Vektor zum Einschleusen von shRNAs in Lentiviren (TRC Konsortium)
pRRL	Vektor zum Transfer von Genen in Lentiviren

2.3.2.2. Lentivirale Verpackungsplasmide

psAX.2	Plasmid, welches für das lentivirale Virionen-Verpackungssystem (HIV gag, pol, rev) codiert (Naldini et al, 1996)
pMD2.G	Plasmid, welches für die lentiviralen Hüllproteine (VSV-G env) codiert (Naldini et al, 1996)

2.3.2.3. Expressionsvektoren

Folgende DNA-Plasmide waren bereits in der Sammlung der Arbeitsgruppe Prof. Eilers vorhanden bzw. wurden freundlicherweise von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt.

pLKO puro shLuziferase	pLKO-Vektor mit Puromycin-Resistenz und shRNA gegen Luziferase mRNA
pLKO puro shMiz1 #1	pLKO-Vektor mit Puromycin-Resistenz und shRNA gegen humane Miz1 mRNA
pLKO puro shMiz1 #2	pLKO-Vektor mit Puromycin-Resistenz und shRNA gegen humane Miz1 mRNA
pLKO puro shMyc	pLKO-Vektor mit Puromycin-Resistenz und shRNA gegen humane Myc mRNA
pRRL puro Miz1 wt	pRRL-Vektor mit Puromycin-Resistenz und CDS von humanem <i>MIZ1</i> für die lentivirale Expression

pGEX GST-Miz1 Δ POZ pGEX4T1 Vektor zur Expression von GST-Miz1 Δ POZ-Fusionsprotein in *E. coli*

2.4. Antikörper und Peptide

2.4.1. Primärantikörper

2.4.1.1. Primärantikörper für Immunoblots

α - β -Aktin monoklonaler Maus- α - β -Aktin Antikörper (Klon AC-15, Sigma, A5441),
Verdünnung 1:10.000

α -Myc monoklonaler Maus- α -Myc Antikörper (Klon 9E10, eigene Herstellung),
Verdünnung 1:500

α -Miz1 monoklonaler Maus- α -Miz1 Antikörper (Klon 10E2, eigene
Herstellung), Verdünnung 1:500

α -Vinculin monoklonaler Maus- α -Vinculin Antikörper (Klon hVIN-1, Sigma),
Verdünnung 1:20.000

2.4.1.2. Antikörper für die Chromatin-Immunpräzipitation

α -Max polyklonaler Kaninchen- α -Max Antikörper (Klon C-17, Santa Cruz)

α -Miz1 monoklonaler Maus- α -Miz1 Antikörper (AS 637-803, eigene
Herstellung)

α -Miz1 polyklonaler Ziege- α -Miz1 Antikörper (Klon N-17, Santa Cruz)

α -Miz1 polyklonaler Ziege- α -Miz1 Antikörper (Klon C-19, Santa Cruz)

α -Miz1 polyklonaler Ziege- α -Miz1 Antikörper (Klon G-18, Santa Cruz)

α -Miz1 monoklonaler Maus- α -Miz1 Antikörper (Klon 10E2, eigene Herstellung)

α -Myc polyklonaler Kaninchen- α -Myc (Klon N-262, Santa Cruz)

α -Pol II polyklonaler Kaninchen- α -RNA-Polymerase II (Klon N-20, Santa Cruz)

α -Pol II monoklonaler Maus- α -RNA-Polymerase II Antikörper (Klon 8WG16,
Covance)

2.4.1.3. Kontrollseren für die Chromatin-Immunpräzipitation

Maus IgG polyklonales Mausserum (Sigma)

Kaninchen IgG	polyklonales Kaninchenserum (GE Healthcare)
Ziegen IgG	polyklonales Ziegenserum (Santa Cruz)

2.4.1.4. Antikörper für *Supershift Assays* im EMSA

α -Miz1	polyklonaler Ziege- α -Miz1 Antikörper (Klon N-17, Santa Cruz)
α -Miz1	polyklonaler Ziege- α -Miz1 Antikörper (Klon C-19, Santa Cruz)
α -Miz1	polyklonaler Ziege- α -Miz1 Antikörper (Klon G-18, Santa Cruz)
GST	polyklonaler Ziege- α -GST Antikörper (GE Healthcare)

2.4.2. *Sekundärantikörper für Immunoblots*

α -Maus-HRP	Esel- α -Maus-Immunglobulin, gekoppelt an die Meerrettichperoxidase (Amersham)
--------------------	---

2.4.3. *Peptide für die Elution im reChIP*

Miz1 N-17	Peptid, welches für die Herstellung des Miz1 N-17 Antikörpers benutzt wurde (Santa Cruz)
Miz1 C-19	Peptid, welches für die Herstellung des Miz1 C-19 Antikörpers benutzt wurde (Santa Cruz)
Max C-17	Peptid, welches für die Herstellung des Max C-17 Antikörpers benutzt wurde (Santa Cruz)

2.5. Chemikalien

Mit Ausnahme weniger Chemikalien (dann extra angegeben) wurden Produkte der Firmen Acros Organics, AppliChem, Calbiochem, Difco, Invitrogen, Merck, Roth und Sigma bezogen, die der Qualität für die Molekularbiologie entsprachen. Feinchemikalien in höchstem Reinheitsgrad wurden von den Firmen Invitrogen und Sigma verwendet. Radioaktiv markiertes γ -³²P-ATP wurde von Hartmann Analytics erworben.

2.6. Standards und Enzyme

2.6.1. *Standards*

DNA-Marker	1 kb DNA <i>Ladder</i> (NEB)
------------	------------------------------

Protein-Marker *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas)

2.6.2. Enzyme und Kits

44K Whole Human Genome Array G4845A	Agilent
Amicon® Ultra Centrifugal Filters, 100 K	Millipore
DNase-freie RNase A	Sigma
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo
Illustra ProbeQuant™ G-50 Micro Columns	GE Healthcare
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit	Invitrogen
Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kit	Invitrogen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RNase-freie DNase I	Qiagen
Sera-Mag Oligo(dT) beads mit Puffer-Kit	Thermo
StdSens Experion RNA Chip	Bio-Rad
SYBR Green qPCR Master Mix	Thermo Scientific
T4 Polynukleotidkinase	NEB
Two-color Quick Amp Labeling Kit	Agilent

2.7. Puffer und Lösungen

Blockierungslösung für PVDF-Membranen	5 % (w/v) BSA in TBS-T
Bradford-Reagenz	0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
	4,7 % (w/v) Ethanol 95 %
	8,5 % ortho-Phosphorsäure
ChIP-Lysepuffer I	5 mM PIPES, pH 8
	85 mM KCl
	0,5 % (v/v) NP-40

Material

ChIP-Lysepuffer II (RIPA)	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 1 % (v/v) NP-40 1 % (w/v) DOC 0,1 % (w/v) SDS 1 mM EDTA
ChIP-Waschpuffer I	20 mM Tris-HCl pH 8,1 150 mM NaCl 2 mM EDTA 0,1 % (w/v) SDS 1 % (v/v) Triton X-100
ChIP-Waschpuffer II	20 mM Tris-HCl pH 8,1 500 mM NaCl 2 mM EDTA 0,1 % (w/v) SDS 1 % (v/v) Triton X-100
ChIP-Waschpuffer III	10 mM Tris-HCl pH 8,1 250 mM LiCl 1 % (v/v) NP-40 1 % (w/v) SDS 1 mM EDTA
ChIP-Elutionspuffer	1 % (w/v) SDS 100 mM NaHCO ₃
Coomassie-Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure 20 % (v/v) Methanol
Coomassie-Färbelösung	25 % (v/v) Isopropanol

Material

	10 % (v/v) Essigsäure
	0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
DNA Ladepuffer (6 x)	10 mM EDTA; pH 8,0
	0,2 % (w/v) Orange G
	40 % (w/v) Saccharose
EMSA-Bindepuffer (10 x)	100 mM Tris-HCl pH 7,5
	10 mM DTT
	10 mM EDTA
	50 mM MgCl ₂
	10 mM ZnCl ₂
	50 % Glycerol
Glutathion-Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0
	20 mM reduziertes Glutathion
Natives Polyacrylamidgel 7%	7 % Acrylamid/Bisacrylamid 30 (37,5:1)
	0,5 x TBE (5 x)
	0,1 % (w/v) APS (10 %)
	0,1 % (v/v) TEMED
PBS	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	10,1 mM Na ₂ HPO ₄
	1,76 mM KH ₂ PO ₄
PEI-Transfektionslösung	450 µl PEI (10 %, MW 25.000 g/mol)
	150 µl HCl (2 N)
	49,5 ml aqua bidest.
reChIP-Elutionspuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5

Material

	150 mM NaCl
	1 % (v/v) NP-40
	1 % (w/v) DOC
	0,1 % (w/v) SDS
	1 mM EDTA
	16 µg Peptid pro Ansatz
Sammelgel 4 %	4 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid 30 (37,5:1)
	125 mM Tris-HCl, pH 6,8
	0,1 % (w/v) SDS
	0,1 % (w/v) APS
	0,1% (v/v) TEMED
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-Base
	250 mM Glycin
	0,1 % SDS
SDS-Probenpuffer (3 x)	187,5 mM Tris-HCl pH 6,8
	30 % (v/v) Glycerin
	6 % SDS
	0,03 % Bromphenolblau
	2 M β-Mercaptoethanol
STE-Puffer (10 x)	1 M NaCl
	100 mM Tris-HCl pH 7,4
	10 mM EDTA pH 8,0
TAE (50 x)	2 M Tris-HCl pH 8,0
	5,7 % Essigsäure
	50 mM EDTA

Material

Tankblot-Puffer	192 mM Glycin 31 mM Tris-Base 0,004 % SDS 25 % Methanol
TBE (5 x)	450 mM Trisbase 450 mM Borsäure 10 mM EDTA
TBS (20 x)	500 mM Tris-Base; pH 7,4 2,8 M NaCl
TBS-T	25 mM Tris-HCl pH 7,4 0,2 % Tween-20 140 mM NaCl
TE	10 mM Tris-Base pH 8,0 1 mM EDTA
Trenngel 10 %	10 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid 30 (37,5:1) 375 mM Tris-HCl pH 8,8 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) APS 0,1% (v/v) TEMED
Trypsinlösung	0,25 % Trypsin 5 mM EDTA 22,3 mM Tris-HCl pH 7,4 125 mM NaCl

2.8. Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterialien, wie z. B. Reaktionsgefäße, -röhrchen und Zellkulturmaterial wurden von den Firmen Applied Biosystems, Eppendorf, Greiner, Kimberley-Clark, Nunc, Sarstedt und VWR International bezogen.

2.9. Geräte und Membranen

Blottingapparatur	Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad)
Durchflusszytometer	FACSCanto II (BD Biosciences)
Entwicklermaschine	LAS-4000 (Fujifilm Global)
Heat Sealing	ALPS™ 50V (Thermo)
Heizblock	Dry Bath System (STARLAB) Thermomixer® comfort (Eppendorf)
Mikroskop	Axiovert 40CFL (Zeiss)
PCR-Gerät	Mastercycler pro S (Eppendorf)
Peristaltische Pumpe	Minipuls 3 (Gilson)
PhosphorImager	400E (Molecular Dynamics)
Photometer	Ultrospect™ 3100 <i>pro</i> UV/Visible (Amersham Biosciences)
Spektralphotometer	NanoDrop 3000 (Thermo Scientific)
PVDF-Transfermembran	Immobilon-P-Transfermembran (Millipore)
qRT-PCR	Mx3000P (Stratagene)
Schüttelinkubator	Model G25 (New Brunswick Scientific)
SDS-PAGE-Apparatur	Minigel (Bio-Rad) Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad)
Sonifiziergerät	Digital Sonifier® W-250 D (Branson)
Spannungsquellen	Power Pac (Bio-Rad)
Sterilwerkbank	HeraSafe (Heraeus)
Universalschüttler	SM-30 (Edmund Bühler GmbH)
UV-Tisch	Maxi-UV-Leuchttisch (PEQLAB)

Wasserbad	Julabo 5M-5M Bad/Umwälzthermostat (Julabo)
Whatman-Filterpapier	Gel-Blotting Papier (Schleicher und Schuell)
Zellkulturinkubator	BBD 6220 (Heraeus)
Zellzähler	CASY-Zellzähler (Innovatis)
Zentrifugen	Galaxy MiniStar (VWR International)
	Eppendorf 5417 R (Eppendorf)
	Eppendorf 5425 (Eppendorf)
	Eppendorf 5430 (Eppendorf)
	Multifuge 1S-R (Heraeus)
	Avanti J-26 XP (Beckman Coulter)

2.10. Software

Acrobat Professional v8.1.5	Adobe Systems, Inc
Bedtools v2.11.2	Quinlan & Hall, 2010
Bowtie v0.12.7	Langmead, 2010
Feature Extraction v10.1.1.1	Agilent
GSEA v1.0	Subramanian et al, 2005
Illustrator v13.0.2	Adobe Systems, Inc.
Integrated Genome Browser v6.4.1	Nicol et al, 2009
Java Tree View v12.9.0	Saldanha, 2004
Mac OS X v10.5.8	Apple Inc.
MACS v1.4.2	Zhang et al, 2008
Microsoft Office 2008 Mac	Microsoft Corporation
MultiGauge v3.2	Fujifilm Corporation
Photoshop v10.0.1	Adobe Systems, Inc.
Prism v4.0	GraphPad Software, Inc.
R v2.15.2	R Foundation
Samtools v1.4	Li et al, 2009

SeqMiner v1.3.3 Ye et al, 2011

2.11. Online Programme und Datenbanken

CEAS	Ji et al, 2006 http://ceas.cbi.pku.edu.cn/
DAVID	Huang da et al, 2009a; Huang da et al, 2009b http://david.abcc.ncifcrf.gov/
<i>DNA Sequence Logo Generator</i>	Persikov & Singh, 2014
<i>Galaxy</i>	Giardine et al, 2005; Blankenberg et al, 2010; Goecks et al, 2010 https://main.g2.bx.psu.edu/
GEO	Edgar et al, 2002 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/
<i>MEME Suite</i>	Bailey et al, 2009 http://meme.nbcr.net/meme/
MSigDB v3.1	Subramanian et al, 2005 http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp
Primer3 v0.4.0	Rozen & Skaletsky, 2000 http://frodo.wi.mit.edu/
Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
<i>UCSC liftOver tool</i>	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver
<i>UCSC Table Browser</i>	Karolchik et al, 2004 http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables?command=start
Universal ProbeLibrary Assay Design Center	https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp?id=UP030000

2.12. Verwendete, bereits publizierte Datensätze

Antikörper	Zelllinie	GEO-Zugangsnummer
H3K27Ac	HeLa	GSM733684
H3K4me3	HeLa	GSM945201

Material

Miz1 (G-18)	MDA-MD231	GSM1181982
Miz1 (H-190)	neuronal Vorläuferzelle	GSM1181980
Myc	MCF-7	GSM822301
Myc	HeLa	GSM822286
p300	HeLa	GSM935500
RNA Pol III	HeLa	GSM501710

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmidamplifikation

Chemisch kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, 1 μg des zu transformierenden Plasmids zugegeben und durchmischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugefügt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden 30 Sekunden bei 14.000 U/min zentrifugiert, das Pellet in 100 μl LB-Medium resuspendiert und auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte mit Ampicillin ausgestrichen. Für eine Plasmidaufreinigung im großen Maßstab (Maxi-Präparation) wurden die Bakterien nicht ausgestrichen, sondern in 200 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium überführt. Agarplatten beziehungsweise Flüssigmedium wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.2. Herstellen und Auftauen von Bakterienstocks

Damit Plasmide nicht immer frisch in Bakterien transformiert werden mussten, wurde ein Bakterienstock angelegt. Hierfür wurden aus einer frischen Bakterienkultur 800 μl abgenommen, mit 200 μl Glycerol versetzt und bei -80 °C zur langfristigen Lagerung eingefroren. Für eine erneute Kultivierung wurde eine kleine Menge von dem gefrorenem Stock mit einer sterilen Impföse abgekratzt, in frischem LB-Medium resuspendiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.3. Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus 200 ml Flüssigkulturen erfolgte mit Hilfe des *PureLink™ HiPure Plasmid Maxiprep Kit* (Invitrogen) gemäß den Herstellerangaben. Die aufgereinigte DNA wurde in aqua bidest. gelöst, die Konzentration auf 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellt und bei -20 °C gelagert.

3.1.4. Messung der Nukleinsäurekonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration von DNA oder RNA wurde die Absorption bei 260 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers gemessen. Die Reinheit wird durch den Quotienten der Extinktion bei 260 nm und 280 nm (Absorptionsspektrum von Proteinen) ermittelt. Für DNA sollte dieser Quotient bei etwa 1,8, für RNA bei 2,0 liegen.

3.1.5. Hybridisierung von DNA-Oligonukleotiden

Für *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) wurden DNA-Oligonukleotide in STE-Puffer verdünnt (Hybridisierungsansatz) und im PCR-Gerät mit folgendem Programm hybridisiert:

98 °C 3 min

97 °C 1 min

96 °C 1 min



15 °C 1 min

Hybridisierungsansatz: 10 µl Oligonukleotid 1 (100 pmol/µl)
 10 µl Oligonukleotid 2 (100 pmol/µl)
 10 µl STE-Puffer (10 x)
 ad 100 µl aqua bidest.

3.1.6. Radioaktive Markierung und Aufreinigung von DNA Oligonukleotiden

Um Oligonukleotide radioaktiv zu markieren wurde deren 5'-Ende mit T4 Polynukleotidkinase und ³²P-haltigem ATP phosphoryliert. Dafür wurde ein Markierungsansatz hergestellt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden überschüssige Nukleotide mit *illustra ProbeQuant™ G-50 Micro Columns* (GE Healthcare) entsprechend den Herstellerangaben entfernt.

Markierungsansatz: 1 µl hybridisiertes Oligonukleotid (10 pmol/µl)
 5 µl γ-³²P-ATP (10 mCi/ml, Hartmann Analytic)
 2 µl T4 Polynukleotidkinase-Puffer (10 x) (NEB)
 1 µl T4 Polynukleotidkinase (NEB)
 ad 20 µl aqua bidest.

3.1.7. Isolation von RNA

Zur Isolation von RNA wurden Zellen mit kaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber von den Kulturschalen gelöst und anschließend mittels Zentrifugation pelletiert (400 x g, 5 min, 4 °C). RNA für eine Microarray-Analyse wurde mit Hilfe des *RNeasy Mini Kits* (Qiagen) und einem DNase I-Verdau auf der Säule nach Herstellerangaben isoliert. Für die

Expressionsanalyse weniger Gene mittels quantitativer Reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR) wurde RNA mit dem TRIzol[®] Reagenz (Invitrogen) nach Herstellerangaben isoliert. Dafür wurden die Zellpellets in 1 ml TRIzol[®] resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 μ l Chloroform dazugegeben, kräftig gemischt und 10 Minuten zentrifugiert (18.000 x g, 4 °C) um die Phasen zu trennen. Die wässrige, obere Phase wurde abgenommen, mit 500 μ l Isopropanol versetzt und mindestens 10 Minuten auf Eis inkubiert um die RNA zu fällen. Nach anschließender Zentrifugation (18.000 x g, 10 min, 4 °C) wurde das RNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (18.000 x g, 5 min, 4 °C), getrocknet und in 30 bis 100 μ l aqua bidest. gelöst.

3.1.8. cDNA-Synthese

Um die Expression einzelner Gene mittels qRT-PCR zu untersuchen, musste die isolierte Gesamt-RNA mit Hilfe von Zufallshexanukleotid-Primern und reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. 0,2 bis 2 μ g RNA wurden mit aqua bidest. auf ein Volumen von 10 μ l verdünnt, für 2 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Dann wurden 40 μ l cDNA-Syntheseansatz hinzugegeben und für 10 Minuten bei 22 °C, 50 Minuten bei 37 °C und 15 Minuten bei 70 °C inkubiert.

cDNA-Syntheseansatz: 10 μ l M-MLV RT 5 x Puffer (Promega)
 5 μ l dNTPs (2,5 M, Roth)
 2 μ l Zufallshexanukleotid-Primer
 0,2 μ l RiboLock[™] RNase Inhibitor (Fermentas)
 1 μ l M-MLV Reverse Transkriptase (Promega)
 ad 40 μ l aqua bidest.

3.1.9. Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Für die Analyse der Expression bestimmter Gene und die Anreicherung Chromatin-immunpräzipitierter DNA wurde die quantitative PCR verwendet (Deepak et al., 2007). Hierfür wurde die synthetisierte cDNA mit 450 μ l aqua bidest. verdünnt und 10 μ l zu dem PCR-Ansatz gegeben. Von immunpräzipitierter DNA wurden direkt 10 μ l zum PCR-Ansatz gegeben. Falls nicht anders beschrieben, wurden PCR-Reaktionen in Triplikaten durchgeführt und in Diagrammen der arithmetische Mittelwert sowie die Standardabweichung angegeben.

PCR-Ansatz:	5 μ l SYBR Green Mix (Thermo)		
	0,5 μ l Primer 1 (10 pmol/ μ l)		
	0,5 μ l Primer 2 (10 pmol/ μ l)		
	4 μ l aqua bidest.		
PCR-Temperaturprofil:	1 Zyklus	95 °C	15 min
	38 Zyklen	95 °C	60 sec
		60 °C	20 sec
		72 °C	15 sec
	1 Zyklus	95 °C	60 sec
		60 °C	30 sec
		95 °C	30 sec

3.1.10. *Microarray*

RNA für eine genomweite Expressionsanalyse (Microarray) wurde mit dem *RNeasy Mini Kits* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert (siehe Abschnitt 3.1.7) und anschließend mit dem *StdSens Experion RNA Chip* (Bio-Rad) auf Qualität und Quantität überprüft. Die RNA-Proben wurden mit dem *Two-color Quick Amp Labeling Kit* (Agilent) mit Cy5 nach Herstellerangaben markiert. Die Referenz-Probe bestand aus zu gleichen Teilen aus allen untersuchten RNA-Proben und wurde mit Cy3 markiert. Cy5-markierte Proben wurde mit der Referenz-Probe auf einem *44K Whole Human Genome Array G4845A 026652* (Agilent) hybridisiert. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem *DNA microarray scanner G2505C* (Agilent) mit einer Auflösung von 5 μ m und 20 bit und der *Feature Extraction 10.1.1.1* Software (Agilent). Die Microarray wurden durchgeführt von Dr. Michael Krause (IMT Marburg).

3.2. Zellbiologische Methoden

Säugerzellen wurden in einem Zellkulturinkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von 95 % kultiviert.

3.2.1. Auftauen von Zellen

In flüssigem Stickstoff eingefrorene Kryoröhrchen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, mit 10 ml frischem Kulturmedium verdünnt und zentrifugiert (800 x g, 5 min, 20 °C) um das im Einfriermedium enthaltene DMSO (Dimethylsulfoxid) zu entfernen. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und auf eine geeignete Zellkulturschale gegeben. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Die Zellen wurden vor einem Experiment mindestens einmal passagiert.

3.2.2. Passagieren von Zellen

Zum Passagieren und Aussäen von Zellen wurde der Überstand des Kulturmediums abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Um die adhärenen Zellen zu lösen wurde Trypsin-Lösung auf die Zellen gegeben und einige Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden in serumhaltigem Medium aufgenommen und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Sollten Zellen gezählt werden, wurden sie 1:200 mit CASYton verdünnt und mit dem CASY-Zellzähler (Innovatis) gemessen. Die Zahl der ausgesäten Zellen hing von der Größe der verwendeten Zellkulturschalen und der Versuchsdauer ab. Hierbei wurde allerdings beachtet, dass die Zellen am Ende des Experimentes noch nicht 100 % konfluent waren.

3.2.3. Einfrieren von Zellen

Um Zellen für eine längere Lagerung einzufrieren, wurde diese mit Trypsin-Lösung bei 37 °C von der Zellkulturschale gelöst, mit Kulturmedium ab gespült und in ein Probenröhrchen gegeben. Nach einer Zentrifugation (800 x g, 5 min, 20 °C) wurde das Pellet in Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Dieses wurde in einen Isopropanol-Einfrierbehälter (*MrFrosty*) bei -80 °C für 2 Tage eingefroren und anschließend für eine dauerhafte Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

3.2.4. Herstellung von Lentiviren

HEK293T-Zellen wurden mit Plasmid-DNA mit Hilfe der PEI-Methode (Polyethylenimid) transfiziert um Lentiviren für die Überexpression und Depletion von Proteinen zu gewinnen. Es wurde ein Transfektionsansatz mit dem zu transfizierenden Plasmid (pLKO- oder pRRL-Vektor) und den für Virushülle und -verpackung nötigen Plasmiden (psAX.2 und pMD2.G) angesetzt, gut durchmischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Transfektionsansatz:	1 ml	PBS
	23,5 μ l	PEI-Transfektionslösung
	8 μ l	Plasmid (pLKO oder pRRL)
	2,5 μ l	psAX.2
	1,25 μ l	pMD2.G

Der Mediumsüberstand wurde abgesaugt, durch frisches Transfektionsmedium ersetzt und der Transfektionsansatz dazu gegeben. Die Inkubation erfolgte für 6 bis 12 Stunden, anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Zellkulturmedium dazu gegeben (7 ml für Schalen mit 10 cm Durchmesser). Nach 24 Stunden wurde der Mediumsüberstand abgenommen und mit einem Filter (0,45 μ m Porengröße) filtriert. Zu den Zellen wurden erneut 7 ml frisches Medium gegeben, 24 Stunden inkubiert und der erhaltene virushaltige Überstand filtriert. Dieser wurde zur langfristigen Aufbewahrung aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.5. Lentivirale Infektion von Säugerzellen

Der Mediumsüberstand von ausgesäten Zellen wurde abgesaugt, 3 ml frisches Kulturmedium sowie 2 ml virushaltiger Mediumsüberstand (Angaben für eine Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser) dazugegeben. Zur Verbesserung der Infektionseffizienz wurden 4 μ g/ml Polybren dem Medium zugegeben. Nach 12 Stunden wurde der virushaltige Mediumsüberstand entfernt und durch frisches Infektionsmedium ersetzt. Insgesamt wurde mindestens viermal im Abstand von 12 Stunden infiziert. Nach der letzten Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 24 Stunden in frischem Medium kultiviert. Anschließend wurde mit Antibiotika-haltigem Medium selektiert und 72 bis 96 Stunden nach der letzten Infektion geerntet.

3.2.6. Durchflusszytometrie

Zur Bestimmung der relativen Zellgröße wurden unfixierte HeLa-Zellen mittels des Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter*, FSC) an einem BD FACSCanto II Durchflusszytometer gemessen. Diese Experimente wurden von Katrin Wiese durchgeführt.

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. Bakterielle Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Zur Gewinnung rekombinanter Proteine wurden die entsprechenden pGEX4T1-Vektoren in *E. coli* BL21 transformiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. 1 ml dieser Vorkultur wurden zu 200 ml frischem LB-Medium gegeben und bis zu einer optischen Dichte von 0,6 (Absorption im Spektralphotometer bei 600 nm) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) dazu gegeben um die GST-Fusionsproteine für 4 Stunden bei 30 °C zu induzieren. Die Bakterien wurden im Anschluss pelletiert (7.700 x g, 20 min, 4 °C) und zur Aufreinigung in kaltem PBS aufgenommen. PBS und Glutathion-Elutionspuffer wurden kurz vor der Verwendung Protease-Inhibitoren zugesetzt um eine Proteindegradation zu verhindern. Vor Beginn der Induktion und zum Zeitpunkt der Ernte wurde 1 ml der Bakterienkultur entnommen, zentrifugiert (18.000 x g, 1 min, 4 °C), in 100 μ l SDS-Probenpuffer resuspendiert und für eine spätere Kontrolle der Induktion aufbewahrt. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml Aliquots im Eis-Wasser-Bad sonifiziert (10 x 10 sec, 1 min Pause, 30 % Amplitude) und die unlösliche Fraktion abzentrifugiert (18.000 x g, 10 min, 4 °C). Unterdessen wurde eine GST-Sepharosesäule hergestellt, indem die Säule blasenfrei zur Hälfte mit GST-Sepharose (GE Healthcare) gefüllt und anschließend mit 100 bis 150 ml PBS mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe gewaschen wurde (Durchlaufgeschwindigkeit 1-2 ml/min). Dann wurde der proteinhaltige Überstand auf die Säule gegeben und bei einer Geschwindigkeit von 0,2 ml/min an die Matrix gebunden. Nach Waschen der Säule mit 10 bis 15 ml PBS (1 ml/min) wurde das Fusionsprotein mit 10 ml Glutathion-Elutionspuffer eluiert (0,5 ml/min) und das Volumen mit Hilfe von *Amicon*[®] *Ultra Centrifugal Filters* (100 K, Millipore) auf etwa 1 ml reduziert. Die aufgereinigten Fusionsprotein-Lösungen wurden mit 10 % Glycerol versetzt und in Aliquots bei -80 °C zur späteren Verwendung aufbewahrt. Induktion sowie Aufreinigung wurden mit einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung kontrolliert.

3.3.2. Herstellung von Gesamtzell-Proteinlysaten

Um Proteinlysate aus Säugerzellen zu gewinnen wurden Zellen mit kaltem PBS gewaschen und mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst. Nach dem Pelletieren der Zellen (800 x g, 4 min, 4 °C) wurden diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur späteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Gefrorene Zellpellets wurden auf Eis aufgetaut, in RIPA-Puffer resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (18.000 x g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt. Proteinlysate wurden bei -80 °C gelagert.

3.3.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinlysaten wurde mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976 #21) bestimmt. Hierfür wurden 1 µl Lysat, 500 µl Bradford-Reagenz und 500 µl aqua bidest. gemischt und nach 10 Minuten Inkubationszeit die Absorption im Photometer bei 595 nm gemessen. Als Leerwert diente ein Ansatz mit 1 µl RIPA-Puffer. Des Weiteren wurde eine Eichreihe von 1 bis 10 mg/ml BSA mit 1:2 verdünntem Bradford-Reagenz gemessen und die Konzentration der Proteinlysate anhand der Eichgeraden berechnet.

3.3.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinlysate wurden nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) in einer diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Dazu wurden 10 bis 20 µg Proteinlysate mit RIPA-Puffer auf 10 µl aufgefüllt und mit 5 µl 3 x SDS-Probenpuffer versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 95 °C wurden die Proben in die Taschen eines Polyacrylamid-Gels mit einem 4 %igen Sammelgel und einem 10 %igem Trenngel gefüllt. Zum Größenvergleich wurden 2 µl eines vorgefärbten Protein-Markers aufgetragen. Bis zum Erreichen des Trenngels wurde die Elektrophorese bei 80 Volt durchgeführt, anschließend bei 120 Volt bis zum Herauslaufen der Bromphenolblau-Lauffront.

3.3.5. Nachweis von Proteinen im Polyacrylamid-Gel durch Coomassie-Färbung

Um Induktion und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen zu überprüfen, wurden die Proteinlösungen in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mindestens 2 Stunden mit Coomassie-Färbelösung unter ständiger Bewegung inkubiert. Dann wurde die Färbelösung entfernt, Coomassie-Entfärbelösung dazugegeben und mehrere Stunden unter Schütteln der überflüssige Farbstoff entfernt bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Hierbei wurde die Entfärbelösung mehrmals gewechselt.

3.3.6. Immunoblot

Mittels einer SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden im Tank-Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde für eine Minute in Methanol inkubiert und anschließend in Tankblot-Puffer für 2 Minuten gewaschen. Darauf wurde die Membran auf das Gel gelegt und beides zwischen Whatman-Filterpapier und Schwämmchen in die Blot-Apparatur eingespannt. Der Proteintransfer erfolgte für 4 Stunden bei 400 mA unter ständiger Kühlung. Im Anschluss wurde die Membran für eine Stunde in 5 % (w/v) bovines Serumalbumin (BSA) in 1 x TBS-T bei Raumtemperatur blockiert und über Nacht bei 4 °C mit Primärantikörper schwenkend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1 x TBS-T wurde für eine Stunde unter Schwenken mit Sekundärantikörper (1:10.000, in 5 % BSA in 1 x TBS-T) inkubiert und erneut dreimal mit TBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Chemolumineszenz mit dem ECL+ Immunoblot-System (Amersham) nach Herstellerangaben. Die Signale wurden mit Hilfe des LAS-4000 (Fujifilm Global) visualisiert. Immunoblot-Ergebnisse wurden mit der *MultiGauge Software* (Fujifilm Global) quantifiziert.

3.3.7. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) und supershift assay

Die Bindefähigkeit eines Proteins an eine bestimmte DNA-Sequenz wurde mit Hilfe des EMSAs untersucht. Hierfür wurde ein Bindeansatz hergestellt, 20 Minuten bei 16 °C inkubiert und dann sofort auf Eis gestellt bis zur Beladung des Gels. Die Protein-DNA-Komplexe wurden mit einem 7 %igen nativen Polyacrylamidgel getrennt, wobei die Elektrophorese bei 4 °C für 5 Stunden bei 120 V durchgeführt wurde. Zur Visualisierung wurde das Gel mehrere Stunden auf einer *Imaging-Platte* exponiert und die Signale mit einem *PhosphorImager* (Molecular Dynamics) detektiert.

Bindeansatz: 20 ng rekombinantes Protein (siehe Abschnitt 3.3.1)
 1 μ l 32 P-markiertes Oligonukleotid (siehe Abschnitt 3.1.6)
 2 μ l EMSA-Bindepuffer (10 x)
 20 μ g Lachssperma-DNA (Invitrogen)
 ad 20 μ l aqua bidest.

Für *supershift assays* wurde dem Bindeansatz 1 μ g Antikörper zugesetzt.

3.3.8. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP und reChIP)

Die Chromatin-Immunpräzipitation dient der Identifizierung von DNA-Bindestellen eines bestimmten Proteins *in vivo*. DNA-bindende Proteine werden mit DNA vernetzt, das Chromatin aus den Zellen isoliert und fragmentiert. Anschließend werden Chromatin-Fragmente mit spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert und die Anreicherung bestimmter DNA-Sequenzen mit spezifischen qPCR-Primern bestimmt.

3.3.8.1. Isolierung des Chromatins

HeLa Zellen wurden mit 1 % Formaldehyd für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert um eine Quervernetzung von Proteinen mit DNA zu erreichen. Um das Formaldehyd zu neutralisieren wurden die Zellen mit 125 mM Glycin für 5 Minuten bei 37 °C behandelt. Anschließend wurde das Medium entfernt, dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und die Zellen mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale gelöst. Die Zellen von maximal 10 15 cm-Kulturschalen wurden pelletiert (800 x g, 10 min, 4 °C), in 3 ml ChIP-Lysepuffer I mit Protease-Inhibitoren (1:1.000) resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert um die Zellen zu lysieren. Die Zellkerne wurden sedimentiert (800 x g, 5 min, 4 °C), in 1 ml RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitoren (1:1.000) resuspendiert und weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert bevor das Chromatin mit einem Ultraschallgerät (20 min Sonifizierzeit, 10 sec Puls an/30 sec Pause, Amplitude 30 %) auf eine Größe von etwa 200 bp zerkleinert wurde. Es wurde darauf geachtet, dass das Lysat ständig mit einem Eis-Wasser-Ethanol-Bad gekühlt wurde. Die festen Bestandteile der Chromatinlösung wurden abzentrifugiert (18.000 x g, 10 min, 4 °C) und das Chromatin aliquotiert bei -80 °C eingefroren.

3.3.8.2. Kontrolle der Fragmentierungseffizienz

Um eine Abschätzung der erreichten Fragmentgröße vornehmen zu können, wurden 50 μ l des sonifizierten Chromatins mit 250 μ l TE verdünnt und 33 μ l Revertierungsansatz dazu gegeben. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei 37 °C und 6 bis 12 Stunden bei 65 °C unter ständigem leichtem Schütteln. Dabei wurden die Quervernetzungen gelöst und Proteine sowie RNA abgebaut. Im Anschluss wurde die DNA mit Hilfe des *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo) nach Herstellerangaben aufgereinigt und mit 30 μ l aqua bidest. eluiert. Die DNA wurde mit 6 μ l DNA Ladepuffer (6 x) versetzt und anschließend wurde mit einem 1 %igen TAE-Agarose-Gel die Fragmentgröße kontrolliert.

Revertierungsansatz: 12 μ l 1 M Tris-HCl pH 6,5

12 μ l 5 M NaCl

6 μ l 0,5 M EDTA

2 μ l Proteinase K (10 mg/ml) (Roth)

1 μ l RNase A (10 mg/ml) (Roth)

3.3.8.3. Blockieren der Sepharose-beads und *Preclearing* des Chromatins

Protein-A oder -B Sepharose-beads (je nach Herkunft der verwendeten Antikörper) wurden vor der Verwendung mit RIPA-Puffer gewaschen (800 x g, 5 min, 4 °C) und über Nacht bei 4 °C mit 400 μ g/ml Lachssperma-DNA (Invitrogen) und 1 mg/ml BSA blockiert. Anschließend wurden die *beads* pelletiert (800 x g, 5 min, 4 °C) und in einem Volumenteil RIPA resuspendiert um ein 50 %-iges *beads*/RIPA-Gemisch zu erhalten. Die Proteinkonzentration des Chromatins wurde mit der Bradford-Methode (siehe Abschnitt 3.3.3) bestimmt, 200 μ g Protein pro Immunpräzipitation eingesetzt und auf 500 μ l mit RIPA-Puffer aufgefüllt. Um unspezifisch an Sepharose-beads bindendes Chromatin zu entfernen, wurde das Chromatin mit 60 μ l blockierten Sepharose-beads für 6 bis 12 Stunden bei 4 °C rotierend inkubiert, anschließend zentrifugiert (18.000 x g, 30 sec, 4 °C) und der vorgereinigte Chromatin-haltige Überstand für die Immunpräzipitation eingesetzt.

3.3.8.4. Immunpräzipitation

Vor der Immunpräzipitation wurde 1 % des vorgereinigten Chromatins als Input-Probe abgenommen, in 300 μ l ChIP-Elutionspuffer verdünnt und bis zur späteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Für die Immunpräzipitation wurden dem Chromatin 4 μ g spezifischer Antikörper, 15 μ l Immuneserum unbekannter Antikörperkonzentration oder 4 μ g Immunglobulin G (IgG)-Kontrollserum zugesetzt und über Nacht unter Rotation bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 60 μ l blockierte Sepharose-beads hinzugefügt und weitere 4 bis 6 Stunden inkubiert. Die präzipitierten Sepharose-Chromatin-Komplexe wurden je dreimal mit den ChIP-Waschpuffern I, II und III mit Protease-Inhibitoren (1:1000) gewaschen (18.000 x g, 30 sec, 4 °C). Vor der zweimaligen Elution mit je 150 μ l ChIP-Elutionspuffer wurden die *beads* einmal mit TE gewaschen. Die Elution erfolgte bei 30 °C für je 15 Minuten unter starkem Schütteln.

Für einen reChIP wurden das immunpräzipitierte Chromatin zweimal mit je 80 μ l reChIP-Elutionspuffer mit spezifischen Peptid für je 15 Minuten bei 20 °C unter starkem Schütteln inkubiert und das erhaltene Eluat für eine erneute Immunpräzipitation eingesetzt. Die Elution nach der zweiten Präzipitation erfolgte mit zweimal je 150 μ l ChIP-Elutionspuffer.

3.3.8.5. Revertierung, Aufreinigung und Amplifikation der immunpräzipitierten DNA

Die erhaltenen Eluate wurden vereinigt, die abgenommene Input-Probe auf Eis aufgetaut und je 33 μl Revertierungsansatz (siehe oben) hinzugefügt. Nach einer Inkubation für 2 Stunden bei 37 °C und 6 bis 12 Stunden bei 65 °C wurde die DNA mit dem *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und zweimal mit je 75 μl aqua bidest. eluiert. Die DNA wurde mit 350 μl aqua bidest. verdünnt und 10 μl in der anschließenden qPCR eingesetzt (siehe Abschnitt 3.1.10). Dabei wurde die Anreicherung chromosomaler Regionen mit spezifischen Primerpaaren untersucht. Die *Cycle over threshold* (Ct)-Werte für die jeweilige immunpräzipitiert DNA wurde subtrahiert vom Ct-Wert der Input-Probe und als prozentualer Anteil dargestellt.

3.3.9. *ChIP-Seq*

Für einen ChIP-Seq wurde Chromatin aus HeLa-Zellen immunpräzipitiert wie oben (siehe Abschnitt 3.3.8) beschrieben. Allerdings wurde die 14-fache Menge an Chromatin, Antikörper, Sepharose-beads und ChIP-Elutionspuffer verwendet. Die aufgereinigte DNA wurde mit dem *picoGreen Kit* (Invitrogen) quantifiziert.

3.4. Bioinformatische Analyse von ChIP-Seq-Daten

Die Auswertung der ChIP-Seq-Rohdaten wurde mit den unten beschriebenen Programmen durchgeführt. Weitergehende Analysen und statistische Test wurden, falls nicht anders beschrieben, mit Microsoft Excel und R ausgeführt.

3.4.1. *Generierung von peak-Dateien aus ChIP-Seq-Rohdaten*

3.4.1.1. Basecalling, Qualitätsfilter und -kontrolle

Das *Basecalling*, d. h. die Umwandlung der Bilder in Text-Dateien mit Sequenzen und Qualitätsangabe, wurde mit dem RTA-Paket, welches in der Illumina *Genome Analyzer Data Collection Software* (SCS v2.8) enthalten ist, durchgeführt. Anschließend wurden mit Hilfe der CASAVA-Software Fastq-Dateien generiert, wobei nur hochqualitative *reads* (PF-Cluster) verwendet wurden. Die Qualität der Sequenzierung wurde mit Hilfe des FastQC-Skripts überprüft.

3.4.1.2. Reads im Genom positionieren

Um die Position der *reads* im Genom zu bestimmen, wurde Bowtie (Langmead, 2010) benutzt. Zuvor wurde das vorgefertigte humane Referenzgenom hg19 von der Bowtie Internetseite heruntergeladen und im Programm installiert.

```
Befehl: bowtie -t -S -v 2 -m 1 hg19 Dateiname.fastq  
Dateiname_Ergebnis.sam
```

Hierbei erlaubt die Option `-v 2` maximal zwei Fehlpaarungen pro *read* zum Referenzgenom und `-m 1` eliminiert alle *reads*, die an mehr als eine Stelle im Genom positioniert werden können.

Anschließend wurde die `.sam`-Datei mit Samtools (Li et al, 2009) in eine binäre `.bam`-Datei umgewandelt um sie weiter prozessieren zu können.

3.4.1.3. Peak calling und Darstellung von ChIP-Seq Daten im Genome browser

Die Anreicherung der mit Genompositionen versehenen *reads* wurden mit Hilfe des Programms Macs (Zhang et al, 2008) durchgeführt. Außerdem erzeugt Macs eine `.wig`-Datei die in einen *Genome Browser* geladen werden kann um die ChIP-Seq-Profile zu visualisieren.

```
Befehl: macs -t Dateiname_Ak.bam -c Dateiname_Ktr.bam -f BAM -n  
Dateiname_Ergebnis -m 15 -w -S --space 10
```

Das Programm vergleicht lokal die Anreicherung von *reads* erzeugt mit dem spezifischen Antikörper (`Dateiname_Ak.bam`) und der Anreicherung in einem Kontrollexperiment (`Dateiname_Ktr.bam`). Die Option `-m` gibt an, wie stark die Anreicherung über eine Kontrollregion sein soll um ein Model zu erzeugen nach dem die *peaks* bestimmt werden können. Für Myc wurde `-m 25` und für Miz1 `-m 15` gewählt um die erforderliche Anzahl an *peaks* zum Model erzeugen zu erhalten. Das Ergebnis ist eine Datei im `.bed`-Format, die die Information über die genomische Lokalisation, die *peak*-Länge, die Lokalisation des *peak*-Scheitelpunkt (*summit*), p-Wert, Anreicherung über Kontrolle (*fold enrichment*) und *false discovery rate* (FDR) enthält.

Des Weiteren gibt Macs auf Grund der Parameter `-w -s` eine `.wig`-Datei aus, die in einem 10 bp-Fenster (`--space 10`) die Anzahl der *reads* genomweit auflistet. Diese Datei wurde in den *Integrated Genome Browser* (Nicol et al, 2009) geladen, um die Bindeprofile zu visualisieren.

3.4.2. Annotierung von peaks

Das Programm Bedtools (Quinlan & Hall, 2010) bietet eine Vielzahl von Möglichkeiten der Manipulation von .bed-Dateien. Es wurde zum einen benutzt um die identifizierten Bindestellen dem nächstgelegenen Gen zuzuordnen. Hierfür wurde die Funktion `closestBed` verwendet, die zu Regionen, spezifiziert in einer Datei a (z. B. Datei mit Bindestelle) die nächstgelegene Region, spezifiziert in einer Datei b (z. B. Referenzdatei mit Transkriptionsstartstellen (TSS)) identifiziert.

```
Befehl: closestBed -a Dateiname.bed -b Dateiname_Referenz.bed -t first  
> Dateiname_Ergebnis.bed
```

Um eine Referenzdatei zu generieren, wurden der gewünschte Datensatz mit TSS-Koordinaten und Gen-Informationen mit Hilfe des *UCSC Table Browsers* (Karolchik et al, 2004) heruntergeladen. Daraus wurde eine .bed-Datei erstellt, die unter Berücksichtigung der Strangorientierung den Transkriptionsstart, den Transkriptionsstart +1 bp, den Chromosomennamen, Strangorientierung und Gennamen enthielt. Falls mehrere TSS die gleiche Entfernung zu einer Bindestelle haben, sorgt die Option `-t first` dafür, dass die erste in der Referenzdatei vorkommende TSS annotiert wird. Anhand der Ergebnisdatei konnte nun in Abhängigkeit von der Strangorientierung berechnet werden, ob die Bindestelle strangabwärts oder -aufwärts lokalisiert ist und in welcher Entfernung zur TSS sie sich befindet.

3.4.3. Berechnung von Überschneidungen verschiedener Datensätze

Die Überschneidung zweier Datensätze wurde mit der Funktion `intersectBed`, enthalten in dem Bedtools Programm, berechnet.

```
Befehl: intersectBed -a Dateiname_a.bed -b Dateiname_b.bed -wa -wb >  
Dateiname_Ergebnis.bed
```

Hierbei wird ermittelt, welche Bindestelle aus Datei a mit mindestens 1 bp aus Datei b überlappt. Die Optionen `-wa -wb` erlauben eine Auflistung der Daten aus beiden Dateien, falls ein Überlapp vorhanden ist. Gegebenenfalls wurde anstelle von `-wa -wb` die Option `-v` gewählt, wodurch nur Bindestellen ausgegeben werden, die in a vorkommen, aber nicht mit b überlappen.

3.4.4. Generierung von heat maps

Das Erstellen von *heat maps* erlaubte die genomweite Visualisierung von Bindeprofilen in bestimmten genomischen Regionen (z. B. Transkriptionsstartstellen). Zur Generierung wurde das Programm SeqMiner (Ye et al, 2011) benutzt, welches als Referenzdaten eine .bed-Datei mit den zu untersuchenden chromosomalen Koordinaten benötigt, sowie die Bindeprofile als .bam-Datei (siehe Abschnitt 3.4.1.2). Die resultierende Datei enthält, für jede Region definiert in der Referenzdatei, in einem festgelegten Fenster (z. B. 50 bp) die Anzahl der aus den .bam-Dateien ermittelten *reads*. Die Daten wurden nach den gewünschten Parametern (z. B. Myc-Bindung) sortiert und mit Java Tree View (Saldanha, 2004) graphisch dargestellt.

3.4.5. Analyse bekannter Transkriptionsfaktor-Bindemotive

Um die mit ChIP-Seq identifizierten Bindestellen nach bekannten Bindemotiven von Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wurde eine .bed-Datei generiert, die die Scheitelpunkte der Bindestellen +/- 60 bp enthält. Diese Regionen wurden dann mit dem Programm CEAS (Ji et al, 2006) analysiert.

3.4.6. de novo-Motivsuche in DNA-Sequenzen

Die Identifikation und Analyse bisher unbekannter Transkriptionsfaktor-Bindemotive erfolgte mit einigen in MEME *Suite* (Bailey et al, 2009) enthaltenen Programme.

3.4.6.1. MEME-ChIP

Für eine *de novo*-Motivsuche wurden zunächst mittels *Galaxy* (Giardine et al, 2005; Blankenberg et al, 2010; Goecks et al, 2010) die DNA-Sequenzen der *peak*-Scheitelpunkte +/- 50 bp extrahiert. Diese wurde als Input für die *de novo*-Motivsuche mit MEME-ChIP verwendet. Es wurden die voreingestellten Standard-Parameter für die Analyse benutzt.

3.4.6.2. CentriMO

Um die Lokalisation der mit MEME-ChIP identifizierten Motive in den Bindestellen zu analysieren, wurden mittels *Galaxy* die DNA-Sequenzen der *peak*-Scheitelpunkte +/- 200 bp extrahiert, sowie die *Position Weight Matrix* (PWM) des Motivs aus dem MEME-ChIP-Output verwendet. Das Programm CentriMO identifiziert die Bindestellen, die das Motiv enthalten und stellt dessen Verteilung in den Bindestellen graphisch dar.

3.4.6.3. MAST

Das Programm MAST identifiziert das mittels MEME-ChIP gefundene Motiv in einer genomweiten Datenbank und ermöglicht so die Ermittlung aller Gene einer Spezies, die ein solches Motiv enthalten. Um humane Promoterbereiche zu untersuchen wurde die *Homo sapiens* Ensembl (*upstream*)-Datenbank und die PWM des Motivs verwendet.

3.4.7. Funktionelle Analyse identifizierter Zielgene

Um gebundene Zielgene funktionell zu analysieren und eine Anreicherung in spezifischen Gruppen bestimmen zu können, wurde das Online-Programm DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) verwendet. Die Gene wurden als *official gene symbol* in das Programm geladen und die funktionelle Annotierung und Gruppierung wurde an Hand der *gene ontology* (GO)-Gruppen „biologischer Prozess“ (BP) und „molekulare Funktion“ (MF) durchgeführt.

3.5. Bioinformatische Analyse von Microarray-Daten

3.5.1. Auswertung der Rohdaten

Die gemessenen Intensitäten im roten und grünen Fluoreszenzbereich wurden nach der LOWESS-Methode (*locally weighted polynomial regression*) mit dem limma Paket in R normalisiert. Anschließend wurden Sonden mit einem A-Wert ≤ 5 entfernt, da man in diesem Fall von einer unzureichenden Hybridisierung ausgehen muss. Um die differentielle Expression zwischen zwei Proben (*fold change* (FC)) zu bestimmen, wurden die logarithmierten (Basis 2) M-Werte von den logarithmierten M-Werten der Kontrolle subtrahiert ($\log_2FC = M\text{-Wert}_{\text{Probe}} - M\text{-Wert}_{\text{Kontrolle}}$). Ein \log_2FC von 1 entspricht somit einer zweifachen Aktivierung, ein \log_2FC von -1 einer Repression auf die Hälfte des mRNA-Levels in der Kontrolle. Diese Rohdaten-Auswertung wurde von Lukas Rycak vorgenommen.

3.5.2. Generierung von Boxplots

Boxplots zur Veranschaulichung der Regulation großer Datensätze wurden mit R angefertigt. Hierbei ist zu beachten, dass die *whisker* mit der Methode nach Tukey dargestellt wurden, d. h. sie entsprechen dem 1,5-fachen des Interquartilenabstands. Gegebenenfalls vorhandene Ausreißer wurden als Punkte gezeigt.

3.5.3. Analyse der Übereinstimmung mit Gensets aus Datenbanken

Expressionsdaten wurden mit dem Programm GSEA (*gene set enrichment analysis*; Subramanian et al, 2005) auf ihre Korrelation mit bereits beschriebenen Gensets untersucht.

Für die Analyse wurden die qualitätsgefilterten M-Werte in das .gct-Dateiformat umgewandelt sowie eine Referenzdatei, die die verwendeten Sonden mit Gennamen verknüpft, beim Hersteller des Microarrays heruntergeladen. Die für die Korrelation verwendeten Gensets wurden der *Molecular Signature Database* (MSigDB) entnommen. Für die statistische Berechnung der Signifikanz wurden die Gensets permutiert ($n = 1.000$). Alle anderen Parameter wurden bei ihrer Standardeinstellung belassen.

3.5.4. Stützvektormethode (SVM-Algorithmus)

Um zu untersuchen, ob Myc-depletierte HeLa-Zellen eine onkogene Signatur zeigen, wurde das Expressionsprofil mit Hilfe eines linearen SVM-Algorithmus (*Support Vector Machine*) mit *NMYC*-amplifizierten Tumoren klassifiziert. In Myc-depletierten Zellen wurden Gene mit einem \log_2FC von $\pm 0,58$ isoliert und die entsprechenden Gene aus Expressionsdaten *NMYC*-amplifizierter Neuroblastome oder normalem neuronalem Gewebe herausgefiltert. 75 % der verfügbaren Datensätze (die Hälfte davon *NMYC*-amplifizierte Tumore, die andere Hälfte normales Gewebe) wurden als Trainingsdatensätze verwendet um eine Hyperebene festzulegen. Die verbleibenden 25 % der Datensätze wurden dann entsprechend der Hyperebene klassifiziert und im Anschluss wurde berechnet, wieviele Datensätze richtig klassifiziert werden konnten. Um die Genauigkeit der Klassifizierung zu bestimmen, wurde ein Korrelationskoeffizient nach Matthews berechnet. Je näher der Wert an 1 liegt, desto besser ist die Korrelation. Die Analyse wurde von Dr. Frederik Roels durchgeführt.

3.6. Statistik

Falls nicht anders beschrieben, werden Daten als Mittelwerte biologischer Replikate dargestellt. Die Fehlerbalken entsprechen der gemessenen Standardabweichung. Für die Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede wurden die jeweils angegebenen Test durchgeführt. Unterschiede von Boxplots wurden mit einem Wilcoxon-Rangsummentest bei gepaarten Proben oder einem Mann-Whitney-U-Test bei ungepaarten Proben statistisch getestet. Der Überlapp von Bindestellen wurde mit einer hypergeometrischen Verteilung getestet. Für alle weiteren Fragestellungen wurde der Student's t-Test (je nach Fragestellung als gepaarter oder ungepaarter Test) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der Myc- und Miz1-Bindestellen

4.1.1. Verifizierung der ChIP-Seq-Datensätze

Ziel der Arbeit war eine genomweite Identifizierung und Charakterisierung der Bindestellen von Myc und Miz1. Hierfür wurden ChIP-Seq-Datensätze für Myc, Miz1 (Durchführung der ChIP-Experimente von Dr. Steffi Herold, Sequenzierung von Dr. Chia-Lin Wei (Singapur)), RNA-Polymerase II, sowie eine Input-Kontrolle in HeLa-Zervixkarzinomzellen generiert und analysiert. Des Weiteren wurde ein Miz1-ChIP-Seq-Experiment in HeLa-Zellen mit einem zweiten Antikörper (N-17; Datensatz zur Verfügung gestellt von Dr. Elmar Wolf) verwendet. Die verwendeten Datensätze sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. In Spalte 2 ist der jeweils verwendete Antikörper angegeben. Spalte 3 zeigt die Anzahl der *reads*, die nach Qualitätsfilterung (siehe Abschnitt 3.4.1.1) vorhanden sind. Der Verlust von *reads* beim Positionieren (zwischen 8 und 45 %; Vergleich Spalte 3 und 4) kann zum einen dadurch erklärt werden, dass *reads* mehrfach im humanen Genom positioniert werden konnten und deshalb nicht einbezogen wurden. Zum anderen ist davon auszugehen, dass die sequenzierten *reads* zu einem großen Anteil aus Lachs-DNA bestehen, welche zum Blockieren der Sepharose-*beads* verwendet wurde. Den tatsächlichen Teil von Lachs-DNA zu bestimmen ist zur Zeit noch nicht möglich, da die genomische Sequenz von *Salmon salar* bisher nicht publiziert ist. Die mit Macs (*Model-based analysis of ChIP-seq*) (siehe Abschnitt 3.4.1.3) identifizierten Bindestellen (Spalte 5) wurden entsprechend der *false discovery rate* (FDR) der Bindestellen gefiltert. Zudem wurden für spätere Untersuchungen die Bindestellen in Promotoren (definiert von -1 kb bis +0,5 kb relativ zur TSS; diese Definition wurde für alle Analysen im Rahmen dieser Arbeit verwendet) von RNA-Polymerase II-transkribierten Genen berechnet. Für die weiteren Analysen wurde für den Myc- und Miz1-ChIP-Seq in HeLa-Zellen eine FDR von 0,1 angenommen. Dies resultierte in 30.487 Bindestellen für Myc, wobei 7.225 (24 %) in RNA-Polymerase II-transkribierten Promotoren lagen. Für Miz1 ergaben sich 6.086 Bindestellen mit 3.270 (54 %) Promoter-assoziierten *peaks*. Bei Datensätzen, für die keine Anzahl von Bindestellen angegeben ist, wurden keine *peaks* annotiert, weil weiterführende Untersuchung die Generierung von *peak*-annotierten Dateien nicht erforderte.

ChIP-Seq	Anti-körper	Qualitäts-gefilterte reads	Positionierte reads	Bindestellen	Bindestellen in Promotoren
Myc	N-262	24.767.282	13.664.306	30.487	7.225
Miz1	637-803	19.125.018	10.786.542	6.086	3.270
Miz1	N-17	16.702.311	9.989.165	NV	NV
RNA Pol II	8WG16	17.206.052	15.911.922	NV	NV
Input	-	14.508.379	10.278.874	NV	NV

Tab. 4.1: Statistik der in dieser Arbeit bearbeiteten ChIP-Seq-Datensätze.

Die Tabelle zeigt die nach Qualitätsfilterung erhaltenen *reads*, die auf das humane hg19 Genom positionierten *reads*, sowie die Bindestellen, die mit Macs annotiert werden konnten. Des Weiteren ist angegeben, wie viele dieser Bindestellen in Promotoren von RNA-Polymerase II (RNA Pol II) lokalisiert sind. NV (nicht vorhanden) bedeutet, dass in diesen Datensätzen keine *peaks* annotiert wurden.

Die Darstellung der Bindeprofile mit einem *Genome browser* zeigte, dass bisher bekannte Myc/Miz1-Zielgene wie *CDKN2B* (p15^{Ink4A}) und *CEBPA* (c/EBP α) in HeLa-Zellen Myc- und Miz1-gebunden sind (Abb. 4.1 A, B). Allerdings ist festzustellen, dass diese Gene schwach gebunden sind (*reads* < 50). Im Gegensatz dazu gibt es Gene wie *VAMP4* und *INO80* (Abb. 4.1 C, D), welche eine deutlich stärkere Anreicherung zeigen (*reads* > 50). Außerdem ist erkennbar, dass Myc, Miz1 und RNA-Polymerase II sehr nah beieinander binden und dass diese Bindestellen in unmittelbarer Nähe von transkriptionalen Startstellen (TSS) liegen. Diese Beobachtung wird im Abschnitt 4.1.2. detaillierter analysiert.

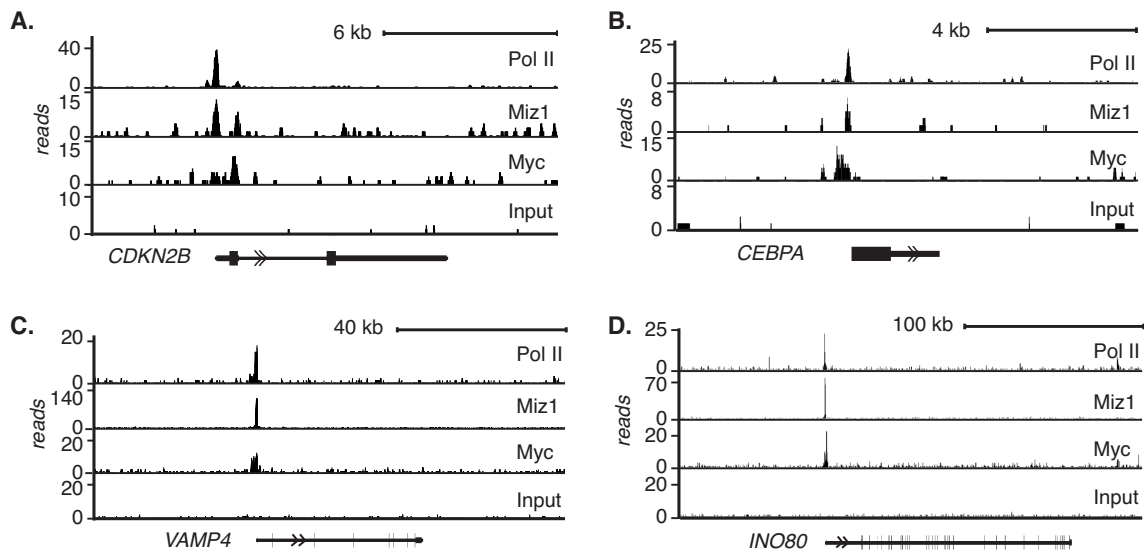


Abb. 4.1: Darstellung von ChIP-Seq-Bindeprofilen in einem *Genome browser*.¹

(A) *CDKN2B* und (B) *CEBPA*, zwei bekannte Myc- und Miz1-Zielgene sind in HeLa-Zellen von Myc- und Miz1-gebunden. Die Abbildungen zeigen das Profil der RNA-Polymerase II zur Identifizierung aktiv transkribierter Gene, die Profile von Myc, Miz1 und das Profil der Input-Probe als Negativkontrolle. *VAMP4* (C) und *INO80* (D) sind Gene, die ein Miz1-Motiv (*VAMP4*) oder eine E-Box (*INO80*) an der Myc/Miz1-Bindestelle haben. Die Gene sind unterhalb der Profile dargestellt, wobei Exons als vertikale Striche und untranslatierte Bereiche als breite horizontale Linie gekennzeichnet sind. Die Pfeile zeigen die Richtung der Transkription an.

Die Validierung der Myc- und Miz1-ChIP-Seq-Datensätze erfolgte mit Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) und anschließender qPCR mit Primern für zufällig gewählte chromosomale Regionen, bei denen eine Anreicherung im Bindeprofil zu sehen war. Der Miz1-Datensatz wurde mit zwei verschiedenen Antikörpern validiert. Hierbei konnten 68 von 71 getesteten Regionen (96 %) mit dem Antikörper Miz1 AS 637-803 (Abb. 4.2 A) und 63 von 71 Regionen (89 %) mit dem Antikörper Miz1 10E2 (Abb. 4.2 B) verifiziert werden. Die vier getesteten Negativkontrollen zeigten in keinem ChIP eine signifikante Anreicherung. Der Myc-ChIP-Seq-Datensatz wurde mit dem im ChIP-Seq verwendeten Antikörper N-262 validiert (Abb. 4.2 C). 61 von 65 Bindestellen (94 %) zeigten eine statistisch signifikante Anreicherung (berechnet mit einem einseitigen, heteroskedatischen t-Test, $p < 0,05$) im Vergleich zur Immunpräzipitation mit Kontrollantikörper („IgG“). Alle vier untersuchten Kontrollregionen waren negativ. Das bereits publizierte Myc/Miz1-Zielgen *CDKN1A* (Herold et al, 2002) konnte ebenfalls mit allen drei Antikörpern validiert werden.

¹ Diese Abbildung wurde in ähnlicher Form in (Walz et al., 2014) veröffentlicht (s. auch die folgenden Seiten).

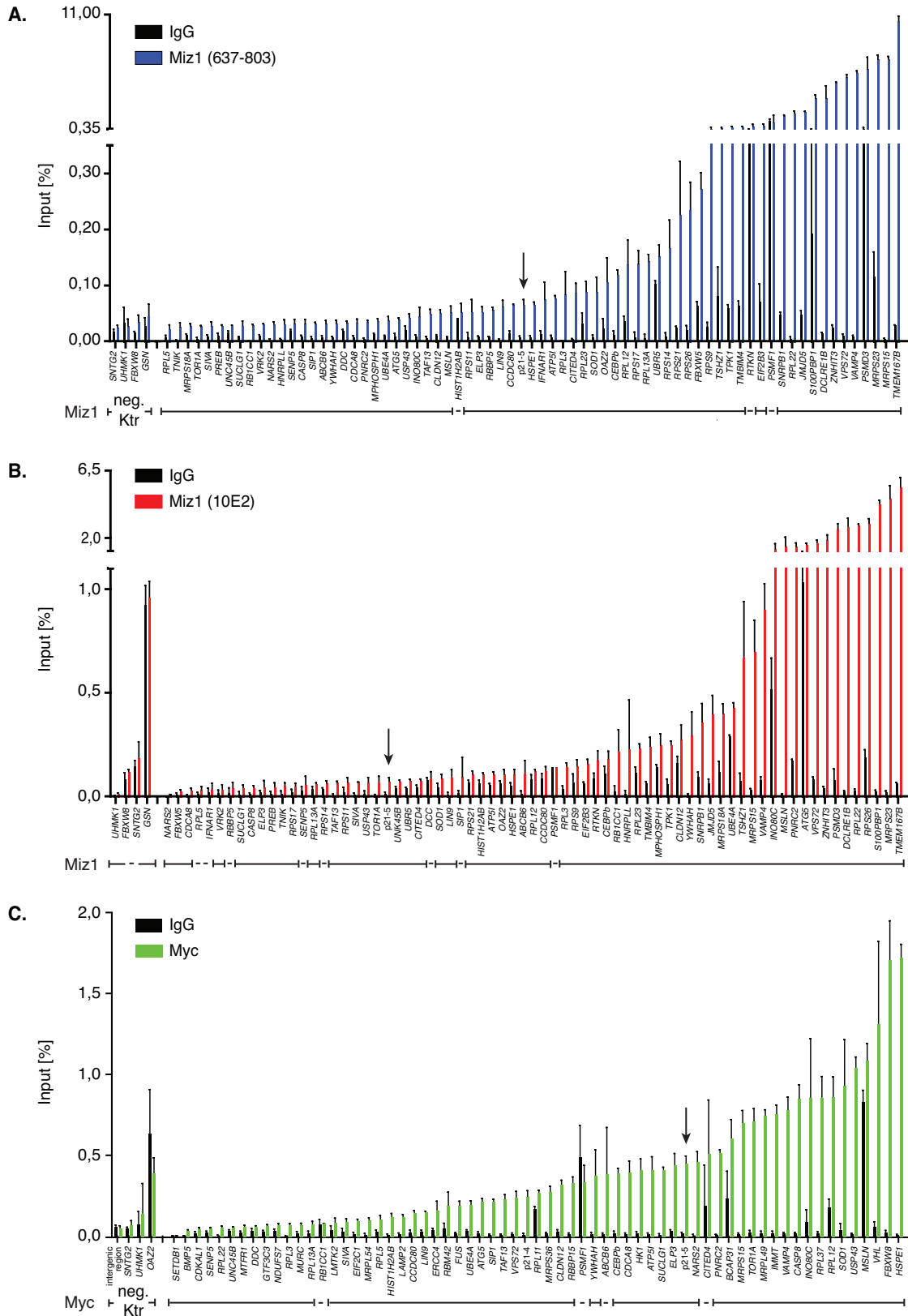


Abb. 4.2: qPCR-Ergebnisse von Chromatin-Immünpräzipitationen zur Verifizierung der ChIP-Seq-Datensätze.¹

(A) Darstellung der Ergebnisse der qPCR nach ChIP mit dem Miz1 AS 637-803-Antikörper. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der Input-DNA welcher präzipitiert werden konnte. 68 der 71 getesteten Regionen waren positiv. Statistische Signifikanz wurde für alle ChIPs mit Hilfe eines heteroskedatischen, einseitigen t-Tests

berechnet. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$. Die Pfeile markieren Primer für Regionen, in denen eine Myc und Miz1-Bindung bereits beschrieben wurde („p21-5“, *CDKN1A*).

(B) Darstellung der Ergebnisse der qPCR nach ChIP mit dem Miz1 10E2-Antikörper. 63 von 71 untersuchten Regionen waren signifikant angereichert.

(C) Darstellung der Ergebnisse der qPCR nach ChIP mit dem Myc N-262-Antikörper. 61 der 65 getesteten Regionen waren signifikant angereichert.

Anschließend wurden die Datensätze mit bereits publizierten Datensätzen verglichen, um zu untersuchen, ob die gefundenen Bindestellen auch in anderen Zelllinien konserviert sind. Hierfür wurde ein Miz1-ChIP-Seq-Datensatz aus der Brustkrebszelllinie MDA-MB231 verwendet, bei dem Miz1 mit dem C-terminalen Antikörper G-18 immunpräzipitiert wurde (Wolf et al, 2013). Des Weiteren wurde ein Datensatz aus HeLa-Zellen verwendet, bei dem mit dem N-terminalen Antikörper N-17 Chromatin-immunpräzipitiert wurde. Eine *heat map* (siehe Abschnitt 3.4.4) der Miz1-Besetzung an allen humanen Promotoren zeigt eine starke Übereinstimmung der Datensätze (Abb. 4.3 A), wobei ersichtlich ist, dass die Sensitivität des N-17-Antikörpers deutlich geringer ist als die der anderen Antikörper. Der Myc-Datensatz wurde mit bereits publizierten Datensätzen des ENCODE-Projekts verglichen. Die Immunpräzipitation wurde für alle ChIP-Seqs mit dem gleichen Myc-Antikörper durchgeführt (N-262), da dieser in allen bisher veröffentlichten Studien als spezifisch beschrieben wurde. Die ENCODE-Daten wurden aus HeLa- und MCF-7-Zellen, einer Brustkrebszelllinie, gewonnen. Die Korrelation zwischen den HeLa-Datensätzen war sehr hoch (Korrelationskoeffizient nach Pearson: 0,75), allerdings war auch ersichtlich, dass in MCF-7-Zellen mehr Gene Myc-gebunden sind (Abb. 4.3 B), die Korrelation somit schlechter ist (Korrelationskoeffizient nach Pearson 0,49 und 0,55). Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien sind denkbar, da je nach Zelllinie die Expression und somit auch das Bindeprofil eines Transkriptionsfaktors variieren kann.

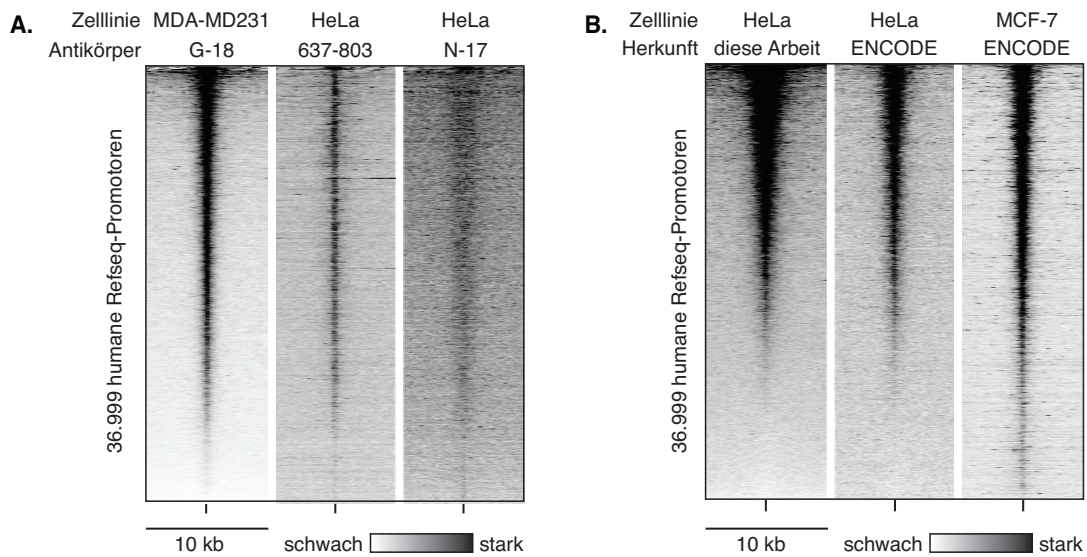


Abb. 4.3: Korrelation der Datensätze mit anderen, zum Teil publizierten Datensätzen.

(A) Vergleich des Miz1-HeLa-Datensatzes mit einem Datensatz aus MDA-MB231-Brustkrebszellen (Antikörper G-18; Wolf et al, 2013) sowie einem zweiten HeLa-Datensatz, für den mit dem Antikörper N-17 immunpräzipitiert wurde. Dargestellt sind alle humanen Promotoren (*UCSC Golden Path RefSeq*-Datenbank) in einem Fenster von 10 kb um den Transkriptionsstart (markiert am unteren Ende der *heat map*). Die *heat map* wurde entsprechend der Miz1-Besetzung in MDA-MB231-Zellen sortiert.

(B) Korrelation des Myc-ChIP-Seq-Datensatzes aus dieser Arbeit mit bereits publizierten Datensätzen an allen humanen Promotoren. Die Datensätze wurden dem ENCODE-Projekt entnommen (HeLa GSM822286, MCF-7 GSM822301) und die Besetzung mit Myc um die TSS +/-5 kb berechnet.

4.1.2. Myc und Miz1 binden gemeinsam an Zielgene

Da nun validierte, genomweite Datensätze zur Bindung von Myc und Miz1 an DNA vorlagen, sollte untersucht werden, ob eine gemeinsame Bindung der Proteine an Zielgene nachgewiesen werden kann. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Myc und Miz1 einen heterodimeren Komplex bilden (Herold et al, 2002; Staller et al, 2001), der verschiedene Zielgene (z. B. *CDKN1A*, *CDKN2B*) reprimiert. Dazu wurden in einer ersten Analyse die gemeinsamen Bindestellen von Myc und Miz1 definiert, indem diejenigen *peaks* gesucht wurden, die in Promotoren von RNA-Polymerase II-transkribierten Genen liegen und in beiden Datensätzen mit mindestens einem Basenpaar überlappen (Abb. 4.4 A). Es wurden 2.879 gemeinsame Myc/Miz1-Bindestellen identifiziert, dies entspricht 88 % beziehungsweise 40 % aller Miz1- und Myc-Bindestellen. Der p-Wert für diesen Überlapp, berechnet mit einer hypergeometrischen Verteilung, ist statistisch signifikant ($p < 2,2E-308$). Dies weist nicht nur darauf hin, dass viele *peaks* überlappen, sondern auch, dass die Anzahl der überlappenden Basenpaare sehr hoch ist. Somit kann davon ausgegangen werden, dass beide Proteine die gleichen chromosomalen Regionen binden. Unterstützt wird diese

Annahme durch die räumliche Nähe der *peak*-Scheitelpunkte. Abb. 4.4 B zeigt die Kerndichteschätzung der Verteilung der Entfernungen von *peak*-Scheitelpunkten in gemeinsamen Myc/Miz1-Bindestellen in Promotoren. Obwohl die durchschnittliche Länge der *peaks* (Myc 687 bp und Miz1 736 bp) recht groß ist, sind bei der Mehrheit der gemeinsamen Myc/Miz1-Bindestellen die Scheitelpunkte weniger als 200 bp voneinander entfernt. Dies ist ein Indiz für die Bildung eines Myc-Miz1-Komplexes, der an DNA bindet. Um in einem Experiment die gemeinsame Bindung von Myc und Miz1 an Myc/Miz1-Zielgenen zu untersuchen, wurde ein reChIP etabliert. Dazu wurde ein erstes ChIP-Experiment durchgeführt, das Chromatin durch Zugabe eines Peptids von den *beads* eluiert und für eine zweite Immunpräzipitation eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde ein Miz1-Miz1-reChIP mit zwei verschiedenen Miz1-Antikörpern durchgeführt, wobei beide getesteten Gene (*VAMP4* und *WDR12*) eine deutliche Anreicherung über IgG-Kontrollantikörper zeigten. Als Negativkontrolle wurde ein Miz1-ChIP ohne Antikörper im reChIP verwendet, um zu zeigen, dass kein funktioneller Antikörper der ersten Immunpräzipitation in der zweiten Immunpräzipitation vorhanden ist. Für die untersuchten Gene konnte eine gemeinsame Bindung von Myc und Miz1 gezeigt werden (Abb. 4.4 C, oben). Eine intergenische Kontrollregion auf Chromosom 11 zeigte keine signifikante Anreicherung (Abb. 4.4 C, unten) im ChIP und reChIP.

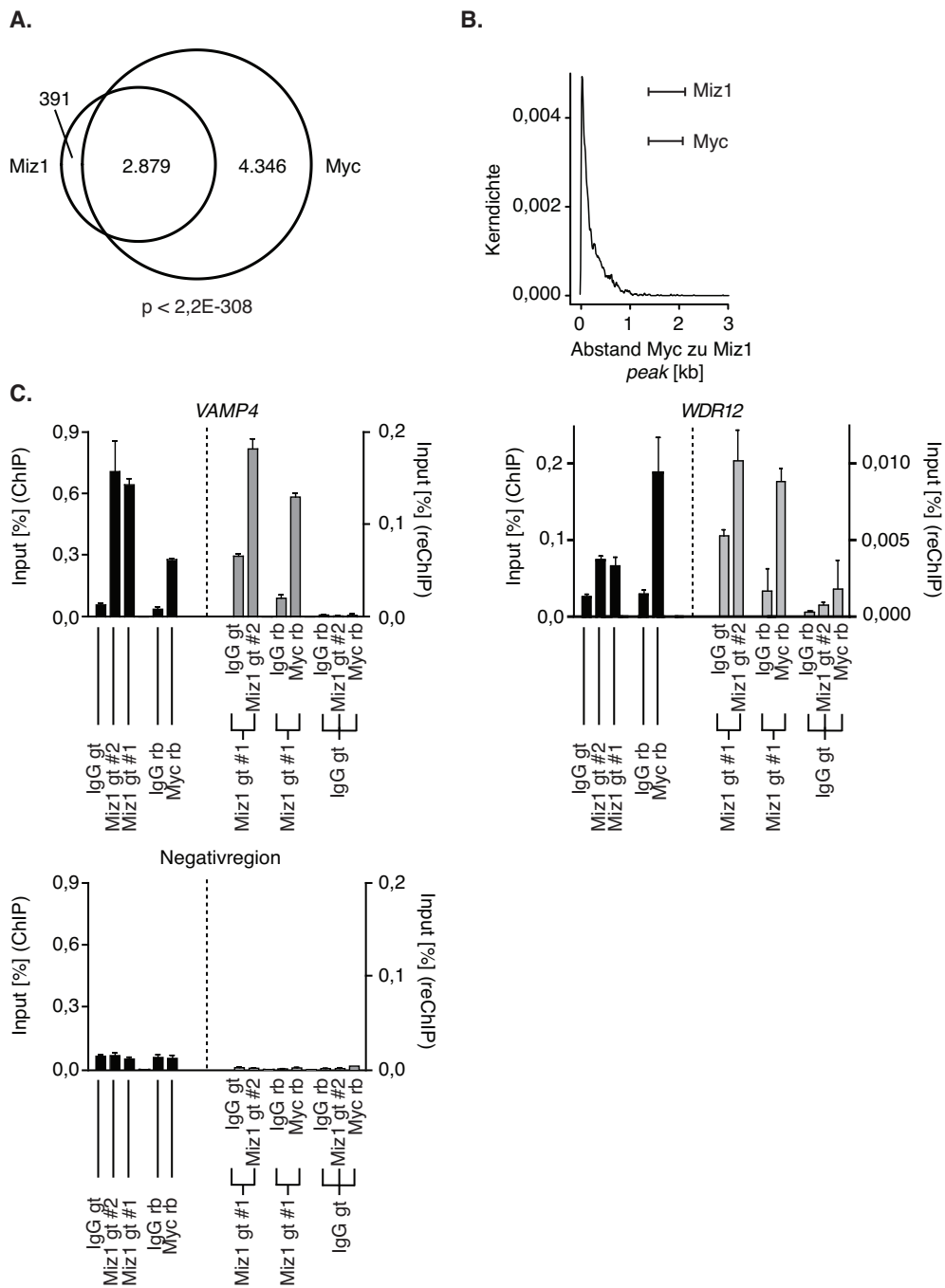


Abb. 4.4: Kooperative Bindung an Myc/Miz1-Zielgenen.¹

(A) Venn-Diagramm zur Veranschaulichung des Überlapps von Myc- und Miz1-Bindestellen in Promoterbereichen von RNA-Polymerase II-Genen. Zur Berechnung des p-Wertes wurde eine hypergeometrische Verteilung benutzt, wobei die Grundgesamtheit die Promoterregionen (-1 kb bis +0,5 kb relativ zur TSS) aller RNA-Polymerase II-Gene darstellt.

(B) Abstand der *peak*-Scheitelpunkte in Myc/Miz1-Bindestellen in RNA-Polymerase II Genen dargestellt mit Hilfe einer Kerndichteschätzung. Es wurden 2.878 Bindestellen verwendet und eine Bandbreite von 7 bp zur Berechnung der Kerndichte benutzt. Rechts oben ist die Länge (arithmetisches Mittel) eines durchschnittlichen Myc- bzw. Miz1-*peaks* als Balken dargestellt.

(C) Miz1-Myc-reChIP zur Darstellung der kooperativen Bindung von Myc und Miz1 an zwei untersuchten Promotoren (*VAMP4* und *WDR12*, oben) und einer Negativregion (unten). Die linke Hälfte dieses Diagramms zeigt die Prozent-Input-Werte nach der ersten Immunpräzipitation, die rechte Seite zeigt die Anreicherung nach einem erneuten ChIP mit dem beschriebenen Antikörper. „IgG gt“ bezeichnet Kontrollantikörper der Spezies

Ziege, „IgG rb“ Kaninchen-Kontrollantikörper. Der Antikörper „Miz1 gt #1“ ist der Antikörper Miz1 C-19, „Miz1 gt #2“ ist der Antikörper Miz1 N-17.

4.1.3. Myc und Miz1 binden an RNA-Polymerase II-Promotoren

Das vorangegangene Experiment gibt Hinweise darauf, dass Myc und Miz1 in Promotoren von RNA-Polymerase II-transkribierten Genen binden. Im nächsten Schritt sollte verifiziert werden, mit welchen RNA-Polymerasen Myc und Miz1 interagieren. RNA-Polymerase I transkribiert die 45S prä-rRNA, RNA-Polymerase II transkribiert proteinkodierende Gene sowie kleine RNAs (microRNA, snRNA und snoRNA) und RNA-Polymerase III tRNA-Gene, 5S-rRNA und einige kleine RNAs. Zuerst wurde die genomweite Bindung von Myc und Miz1 in Promotoren von RNA-Polymerase II-transkribierten Genen untersucht. Hierfür wurde ein Histogramm mit den Abständen der *peak*-Scheitelpunkte zum nächsten Transkriptionsstart von Polymerase II-Genen (benutzt wurde die RefSeq-Genliste aus der *UCSC Golden Path*-Datenbank) erstellt. Dabei wurde die Strangorientierung beachtet, d. h. ein negativer Wert bedeutet, dass die Bindestelle im strangaufwärts gelegenen Bereich eines Genes liegt, ein positiver Wert zeigt eine Lokalisation im Genkörper an. Abbildung 4.5 A (oben) zeigt, dass 50 % der Miz1-Bindestellen sehr nah am Transkriptionsstart liegen (Bereich von +/-500 bp), dies gilt allerdings für nur 21 % der Myc-Bindestellen (mittleres Diagramm). Die deutet darauf hin, dass vor allem viele Myc-Bindestellen auch in *enhancer*-Regionen und in Promotoren von RNA-Polymerase III-Genen liegen (siehe Abschnitt 4.1.4 und 4.1.5). Bindestellen, für die sowohl ein Myc- als auch ein Miz1-*peak* annotiert ist, liegen hauptsächlich in RNA-Polymerase II-Promotoren (65 % in +/-500 bp, Abb. 4.5 A unten). Die Bindung von Myc und Miz1 an aktive RNA-Polymerase II-transkribierte Promotoren konnte ebenfalls mit einer *heat map* gezeigt werden. Hierbei wurde die Besetzung mit RNA-Polymerase II, Myc, Miz1 und die Trimethylierung von Histon H3 an Lysin 4 (H3K4me3) an allen humanen RNA-Polymerase II-Genen untersucht (Abb. 4.5 B). Man erkennt eine deutliche kooperative Bindung von Myc und Miz1 an RNA-Polymerase II-beladenen Genen mit einer offenen Chromatinstruktur, erkennbar an der starken H3K4-Trimethylierung. Wie schon an den Histogrammen in Abb. 4.5 A erkennbar, erfolgt die Bindung sehr nah am Transkriptionsstart der RNA-Polymerase II-Gene.

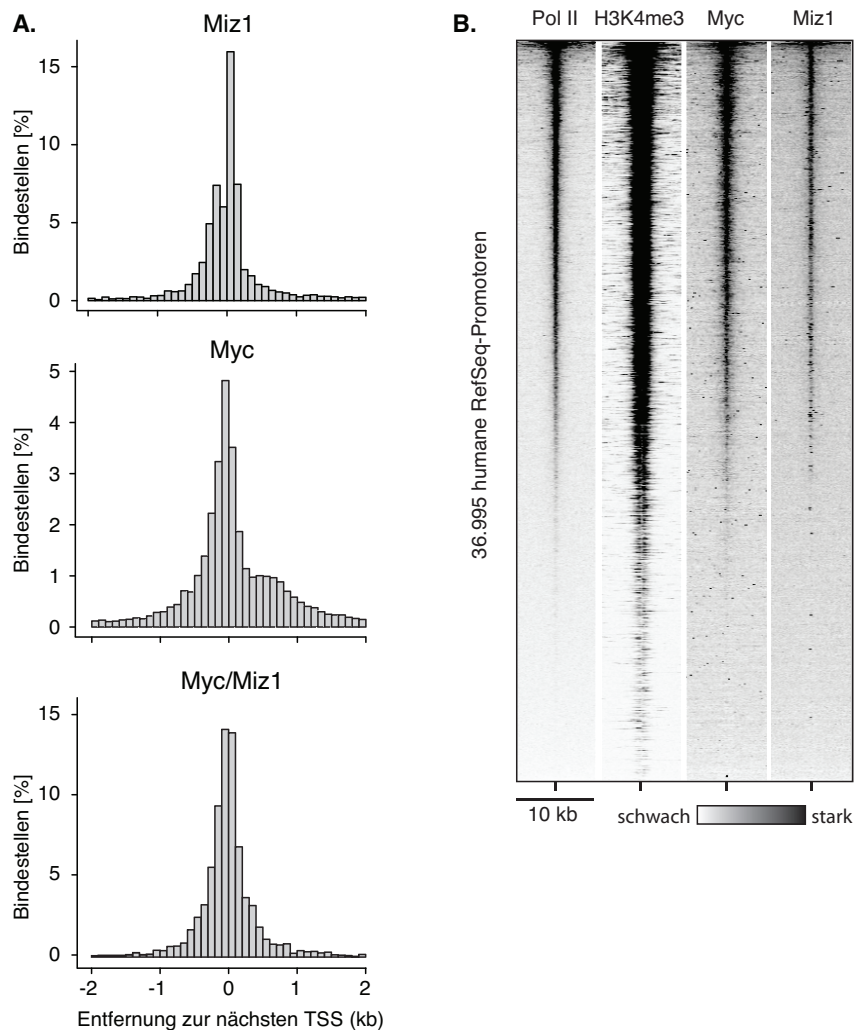


Abb. 4.5: Myc und Miz1 binden in unmittelbarer Nähe der Transkriptionsstartstelle von RNA-Polymerase II-Genen.¹

(A) Histogramme, die die Entfernung der Bindestellen für Miz1 (oben, $n = 6.124$), Myc (mittig, $n = 30.478$) und Miz1 in Myc/Miz1-Bindestellen (unten, $n = 4.237$) zur nächsten TSS von RNA-Polymerase II-Genen. Dargestellt ist eine Region von ± 2 kb zur Transkriptionsstartstelle in 100 bp-Intervallen.

(B) Die Besetzung von Myc und Miz1 korreliert mit RNA-Polymerase II-Besetzung und H3K4-Trimethylierung an humanen Promoterregionen von proteinkodierenden Genen. Die *heat map* zeigt einen Bereich von ± 5 kb um die TSS und wurde nach RNA-Polymerase II-Besetzung sortiert. Der H3K4me3-Datensatz wurde der Datenbank des ENCODE-Projekts entnommen (GSM945201).

4.1.4. In enhancer-Regionen interagiert Miz1 nicht mit Myc

Im vorangegangenen Abschnitt wurde festgestellt, dass ein Großteil der Myc- und Miz1-Bindestellen in RNA-Polymerase II-transkribierten Promotoren liegen. Allerdings ist auch ersichtlich, dass vor allem viele Myc-peaks in anderen Regionen liegen müssen. Eine Möglichkeit ist die Bindung in *enhancer*-Regionen. *Enhancer*-Elemente sind strangauf- oder abwärts gelegene Bereiche, an die Transkriptionsfaktoren binden und die Genexpression

beeinflussen. *Enhancer* liegen zum Teil mehrere Kilobasen von der TSS entfernt, deshalb erfolgt der Kontakt der daran gebundenen Transkriptionsfaktoren mit der Transkriptionsmaschinerie mit Hilfe von Schleifenbildung der DNA. Myc wird in P493-6 B-Lymphozyten an diese genomischen Loci rekrutiert (Lin et al, 2012). Um zu untersuchen, ob Myc und Miz1 in *enhancer*-Regionen binden, wurden zwei verschiedene Datensätze mit *enhancer*-Regionen analysiert. Zum einen wurde ein Datensatz aus HeLa-Zellen gewählt, in dem *enhancer* mit Hilfe von verschiedenen Histonmodifikationen sowie p300-Bindestellen definiert wurden (Heintzman et al, 2007). Zum anderen wurde ein *enhancer*-Datensatz benutzt, der über 21.000 Regionen beinhaltet, welche mit einer Kombination aus 5 Histonmodifikationen in CD4⁺-T-Lymphozyten identifiziert wurden (Fernandez & Miranda-Saavedra, 2012). Von beiden Datensätzen wurde jeweils die Mitte der *enhancer*-Region gewählt und 5 bzw. 10 kb strangauf und -abwärts die Besetzung mit Myc, Miz1 und p300 bestimmt. Anschließend wurden die Regionen entsprechend der stärksten Myc-Besetzung in einem maximalen Abstand von 1 kb zur *enhancer*-Mitte zentriert und auf 8 bzw. 10 kb zugeschnitten. p300 ist ein transkriptioneller Koaktivator mit Histonacetyltransferase-Aktivität, der an aktiven Genen im Promoter und *enhancer*-Bereich bindet (Wang et al, 2005). Die Acetylierung von Histon H3 am Lysinrest 27 ist ein Indikator für aktive *enhancer*-Regionen (Creyghton et al, 2010). In Abb. 4.6 ist ersichtlich, dass in beiden Datensätzen Myc in *enhancer*-Regionen bindet und diese Bindung mit der p300-Bindung korreliert. Miz1 hingegen ist nicht in *enhancer*-Elementen nachweisbar, der Myc/Miz1-Komplex ist also ein Komplex, der spezifisch an Kernpromotoren bindet.

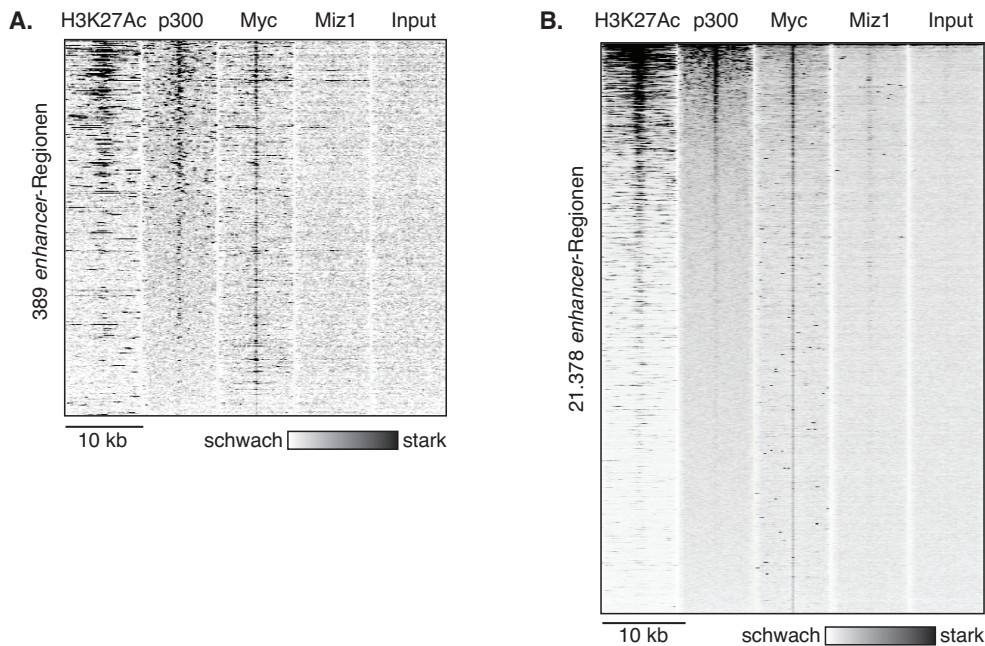


Abb. 4.6: Der Myc/Miz1-Komplex bindet nicht in *enhancer*-Regionen.¹

(A) *Heat map* der Myc- und Miz1-Besetzung an 389 konfidenten *enhancer*-Regionen aus HeLa-Zellen (Heintzman et al, 2007). Zum Nachweis der Bindung von generellen Transkriptionsfaktoren in den definierten *enhancer*-Elementen wurde die p300-Besetzung (ENCODE GSM935500) und die H3K27-Acetylierung (ENCODE GSM733684) ermittelt. Die *enhancer* wurden in einem 1 kb-Fenster entsprechend der stärksten Myc-Besetzung verschoben und nach p300-Besetzung sortiert.

(B) *Heat map* der Myc-, Miz1- und p300-Besetzung und H3K27-Acetylierung in 21.378 *enhancern*, identifiziert in CD4⁺-Zellen mittels 5 Histonmodifikationen (Fernandez & Miranda-Saavedra, 2012) und einer minimalen Entfernung von 1 kb von jeglichem Transkriptionsstart. Die *enhancer* wurden in einem 1 kb-Fenster entsprechend der stärksten Myc-Besetzung verschoben und nach p300-Besetzung sortiert.

4.1.5. Myc- und Miz1-Bindung an RNA-Polymerase I- und III-transkribierten Genen

Die Bindung und Aktivierung von RNA-Polymerase III-transkribierten Genen durch Myc konnte in früheren Studien bereits gezeigt werden (Gomez-Roman et al, 2003). Somit stellte sich die Frage, ob auch Miz1 tRNA-Gene bindet. Die *Genome browser*-Darstellung eines tRNA-Clusters auf Chromosom 1 (Abb. 4.7 A, links) zeigt eine starke Korrelation von Myc- und Miz1-Bindestellen mit der Bindung von RNA-Polymerase III an den dort vorhandenen Genen. Auch die Darstellung einer einzelnen tRNA des Clusters (Abb. 4.7 A, rechts) lässt eine starke Anreicherung über den gesamten Genkörper erkennen. Einige der tRNAs wurden mit einer Chromatin-Immunpräzipitation und spezifischen Primern validiert (Abb. 4.7 B). Die getesteten tRNAs zeigten eine starke Bindung von Miz1 (links), welche auch mit einem zweiten Antikörper verifiziert werden konnte (Antikörper 10E2, nicht gezeigt) und eine schwächere, aber signifikante Anreicherung von Myc (rechts). Um einen genomweiten Überblick über die Assoziation von Myc und Miz1 an tRNA-Promotoren zu erhalten, wurde

eine *heat map* aller humaner tRNA-Gene berechnet (Abb. 4.7 C). Man erkennt eine starke Korrelation von Myc- mit Miz1-Besetzung an aktiv transkribierten tRNAs, erkennbar an der RNA-Polymerase III-Bindung und H3K4-Trimethylierung.

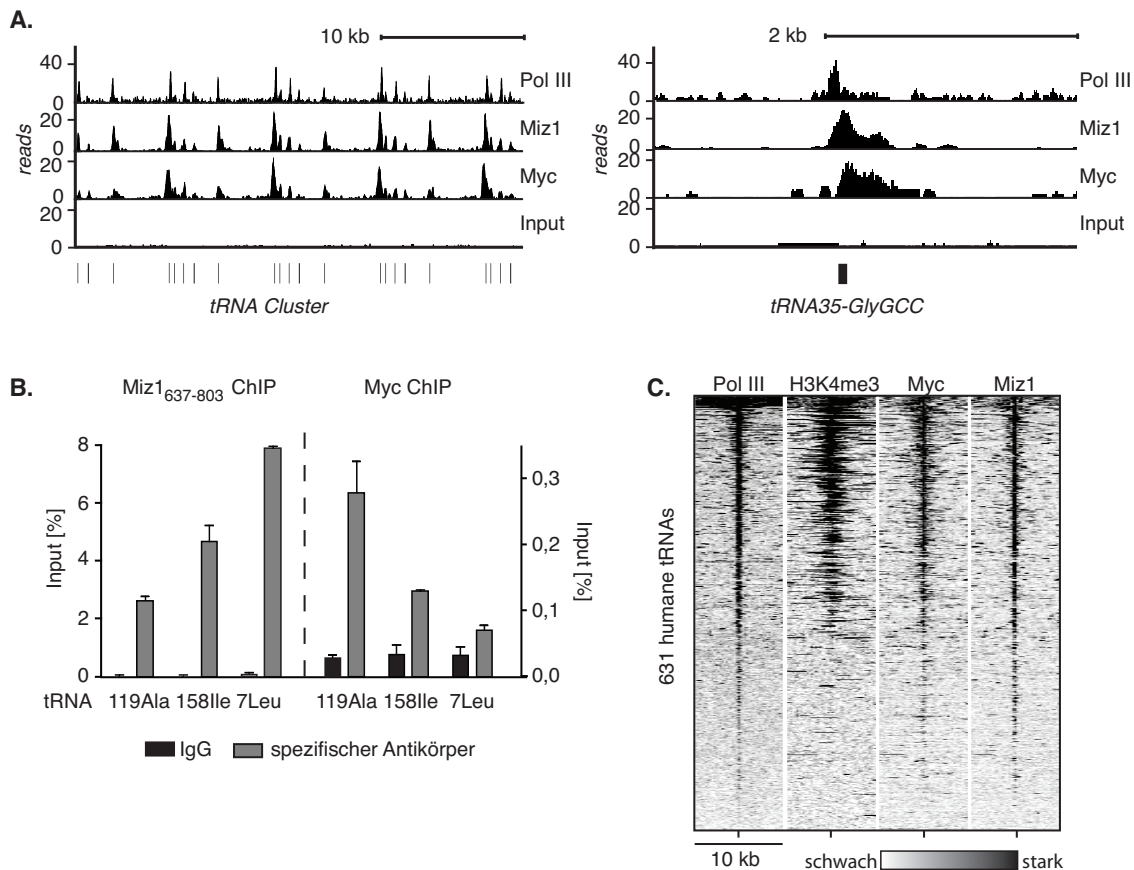


Abb. 4.7: Myc und Miz1 binden in RNA-Polymerase III-Promotoren.¹

(A) Darstellung eines *Genome browser*-Bildes zur Verdeutlichung der Bindung von Myc, Miz1 und RNA-Polymerase III (Barski et al, 2010) an ein tRNA-Cluster auf Chromosom 1 (159.675.000-159.710.000 bp, links). Rechts eine Vergrößerung einer tRNA aus diesem Cluster. Die Richtung der Transkription erfolgt von links nach rechts.

(B) Validierung einiger tRNA-Gene mittels ChIP. Die linke Seite des Diagramms zeigt die prozentuale Anreicherung nach einem ChIP mit Miz1-Antikörper, die rechte Seite die Anreicherung nach Myc-Immunpräzipitation.

(C) Genomweite Analyse der Myc- und Miz1-Besetzung an tRNA-Genen mittels einer *heat map*. Zur Identifizierung aktiver Gene wurde die RNA-Polymerase III-Besetzung (Barski et al, 2010) und die H3K4-Trimethylierung (ENCODE GSM945201) verwendet. Die *heat map* zeigt alle 631 humanen tRNAs (entnommen der UCSC Golden Path tRNA-Datenbank, hg18) in einem 10 kb-Fenster um die TSS in 50 bp-Intervallen.

Neben der Bindung an RNA-Polymerase III-transkribierte Gene ist für Myc bereits eine Bindung und Aktivierung von Polymerase I-transkribierten Genen beschrieben. Das 45S prä-rRNA-Gen liegt im humanen Genom in 5 Clustern mit jeweils mehreren Wiederholungen vor. RNA-Polymerase I transkribiert eine 45S prä-rRNA, die zu 18S, 5,8S und 28S rRNA

prozessiert wird. Während der Prozessierung werden 5'- und 3'-ETS (*external transcribed spacer*) und ITS (*internal transcribed spacer*) entfernt. In P493-B-Zellen wird Myc nach Tetrazyklin-abhängiger Induktion zu rDNA-Loci rekrutiert und aktiviert die rRNA-Expression (Grandori et al., 2005). Um zu testen, ob Myc und Miz1 in HeLa-Zellen an die 45S prä-rRNA binden, wurden Chromatin-Immünpräzipitationen mit Myc- bzw. zwei verschiedenen Miz1-Antikörpern durchgeführt. Die Primer für die anschließende qPCR wurden spezifisch für den Start der Transkription am 5'-ETS gewählt („H42.9“). Man erkennt eine signifikante Anreicherung von Myc in dieser Region, für Miz1 konnte keine Bindung mit einem der verwendeten Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 4.8).

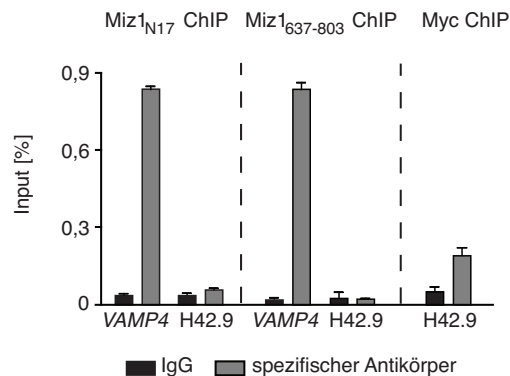


Abb. 4.8: Verifizierung der Bindung von Myc an rRNA.¹

Chromatin-Immünpräzipitation mit einem Myc- und zwei verschiedenen Miz1-Antikörpern. H42.9 ist ein Oligonukleotid, welches im rRNA-Cluster an der TSS des 5'-ETS bindet. In diesem Bereich wurde bereits eine Bindung von Myc in P493-B-Zellen nachgewiesen (Grandori et al, 2005).

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass Myc zusammen mit Miz1 an Promotoren von RNA-Polymerase II- und III-Genen bindet, wohingegen eine Bindung in *enhancer*-Regionen und an rRNA-Genen nur von Myc beobachtet werden konnte. Miz1 kann somit als Transkriptionsfaktor für Kernpromotoren betrachtet werden, der zwar an einer Vielzahl von Transkriptionsstartstellen mit Myc zusammen bindet, allerdings kein generelles Myc-bindendes Protein darstellt.

4.1.6. Max ist Bestandteil des Myc/Miz1-Komplexes

Myc bildet mit seinem Partnerprotein Max einen heterodimeren Komplex, der an E-Box-Sequenzen bindet und die Transkription von Zielgenen aktiviert (Blackwood & Eisenman, 1991). Myc, Miz1 und Max bilden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen heterotrimären Komplex am *CDKN2B*-Promoter (Staller et al, 2001). Um zu untersuchen, ob Max ebenfalls

Bestandteil des Myc/Miz1-Komplexes an stark Miz1-gebundenen Promotoren ist, wurden ChIP-Experimente in HeLa-Zellen mit einem Max-Antikörper, sowie zur Kontrolle mit einem Myc-, bzw. Miz1-Antikörper durchgeführt und mittels qPCR einige Myc/Miz1-Zielgene auf eine Anreicherung von Max getestet. In E-Box-haltigen Promotoren konnte wie erwartet eine starke Max-Bindung verifiziert werden (Abb. 4.9 A). Auch zeigen Myc/Miz1-Zielgene, die deutlich mehr Miz1 als Myc enthalten, eine klare Anreicherung von Max (Abb. 4.9 B). Eine gleichfalls untersuchte Negativregion in einem intergenischen Bereich auf Chromosom 11 zeigte keine statistisch signifikante Anreicherung für Max, Myc und Miz1.

Des Weiteren wurde in einem reChIP-Experiment die gleichzeitige Bindung von Max und Miz1 an Myc/Miz1-Zielgenen untersucht. Dazu wurde in HeLa-Zellen Chromatin-gebundenes Max immunpräzipitiert und nach einer Elution mit spezifischem Peptid eine weitere Immunpräzipitation mit Miz1-Antikörper, bzw. zur Kontrolle mit Max-Antikörper durchgeführt. Eine anschließende qPCR mit spezifischen Primern für die Promoterregionen des *VAMP4*- und *RSRC1*-Gens zeigte eine gleichzeitige Bindung von Max und Miz1 an diesen Genen, während für eine Kontrollregion keine Anreicherung über einer IgG-Kontrolle gemessen werden konnte.

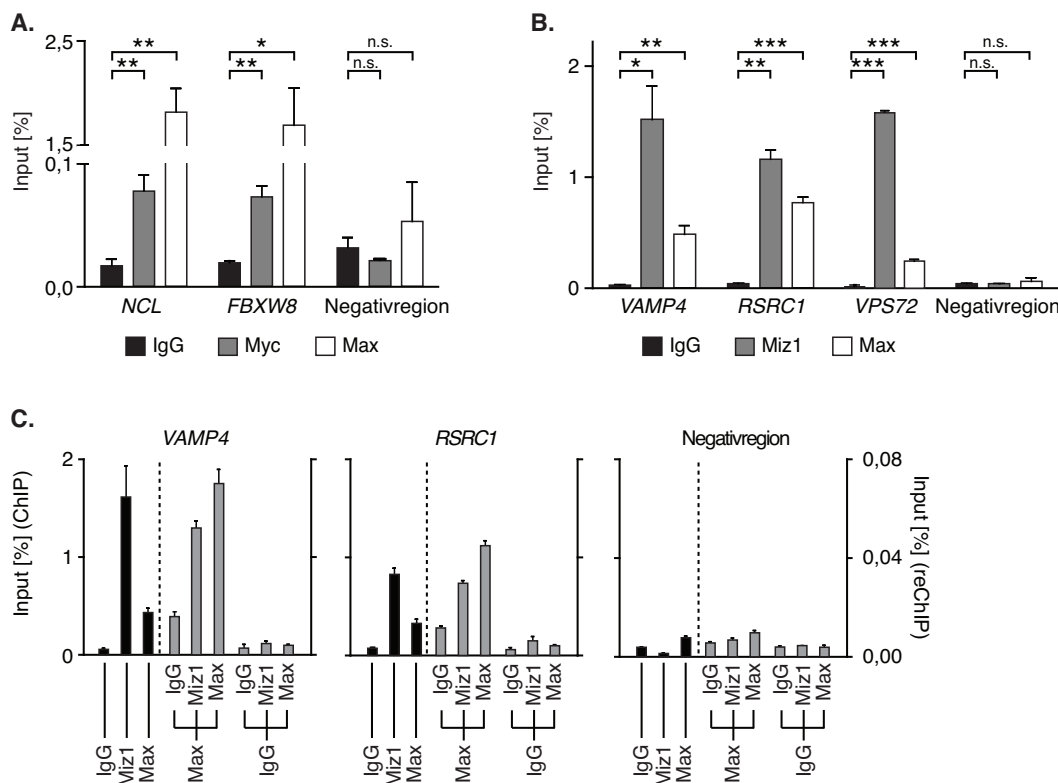


Abb. 4.9: Darstellung der Max-Bindung in Promotoren von Myc/Miz1-Zielgenen.¹

(A) ChIP-Experimente in HeLa-Zellen zur Analyse der prozentualen Anreicherung von Max an E-Box-haltigen Promotoren wie *NUCLEOLIN* und *FBXW8*. Zur Verifizierung der Myc-Bindung an diesen Zielgenen wurde ein Myc-ChIP verwendet. Als Kontrollregion diente eine intergenische Region auf Chromosom 11. p-Werte wurden

mit einem zweiseitigen heteroskedastischen Student's t-Test berechnet (*p-Wert < 0,05; **p-Wert < 0,01; ***p-Wert < 0,001; n.s.: nicht signifikant) und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung technische Triplikate an (n = 3).

(B) Durchführung wie in (A), allerdings wurde hier zur Kontrolle mit einem Miz1-Antikörper immunpräzipitiert und die Anreicherung an Myc/Miz1-Zeilgenen mit starkem Miz1-Signal untersucht. p-Werte wurden mit einem zweiseitigen heteroskedastischen Student's t-Test berechnet (*p-Wert < 0,05; **p-Wert < 0,01; ***p-Wert < 0,001; n.s.: nicht signifikant) und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung technische Triplikate an (n = 3).

(C) Max-Miz1-reChIP zur Verifizierung der gemeinsamen Bindung an zwei untersuchten Myc/Miz1-Zielgenen (*VAMP4*, links und *RSRC1*, Mitte) und einer Negativregion (rechts). Die linke Hälfte jedes Diagramms zeigt die Prozent-Input-Werte nach der ersten Immunpräzipitation, die rechte Seite die Anreicherung nach einem erneuten ChIP. „IgG“ bezeichnet ein Gemisch aus Kontrollantikörpern der Spezies Kaninchen und Maus, für die Miz1-Chromatin-Immunpräzipitation wurde der Antikörper AS 637-803 verwendet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung technischer Triplikate an (n = 3).

4.1.7. Identifizierung eines DNA-Bindemotivs des Miz1-Proteins

4.1.7.1. Die Stärke der Myc- und Miz1-Bindung definiert unterschiedliche Gruppen von Bindestellen

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Myc/Miz1-Bindestellen eine homogene Gruppe von Bindestellen darstellen, oder ob es Unterschiede beispielsweise in der Bindestärke der 2.879 *peaks* gibt. Als Maß für die Bindestärke wurde die Anzahl der *reads* im Scheitelpunkt eines *peaks* gewählt, welche von Macs im Verlauf des *peak calling* (siehe Abschnitt 3.4.1.3) berechnet wird. Abbildung 4.10 A zeigt die Verteilung der *read*-Anzahl pro *peak* in Myc/Miz1-Bindestellen, welche in Promotoren von RNA-Polymerase II-transkribierten Genen liegen. Links sind die *reads* des Myc-*peaks* dargestellt, rechts die des Miz1-*peaks*. Man erkennt, dass es eine große Anzahl von Bindestellen gibt, die wenig Myc bzw. Miz1 gebunden haben (*reads* < 50). Allerdings gibt es Myc- und Miz1-*peaks*, die sehr stark gebunden sind. Daraus stellte sich die Frage, ob Myc/Miz1-Bindestellen mit schwacher Myc-Bindung auch eine schwache Miz1-Bindung zeigen, die Bindestärke also korreliert. Hierfür wurden die Bindestärken von 1.000 Myc/Miz1-Bindestellen mit den stärksten Miz1-Bindungen in ein XY-Diagramm eingetragen (Abb. 4.10 B). Es ist erkennbar, dass in vielen Bindestellen Myc und Miz1 schwach gebunden sind, sowie Gruppen von Bindestellen existieren, die entweder viel Miz1 und wenig Myc (Miz1 ↑/Myc ↓) oder wenig Miz1 und viel Myc (Miz1 ↓/Myc ↑) gebunden haben. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in Miz1 ↓/Myc ↑-Bindestellen die Bindung des Komplexes an DNA über Myc vermittelt wird, während Miz1 an diese Stellen durch Myc rekrutiert wird. An Miz1 ↑/Myc ↓-Bindestellen allerdings könnte die DNA-Interaktion durch Miz1 erfolgen und Myc wird rekrutiert (siehe Abschnitt 4.1.11).

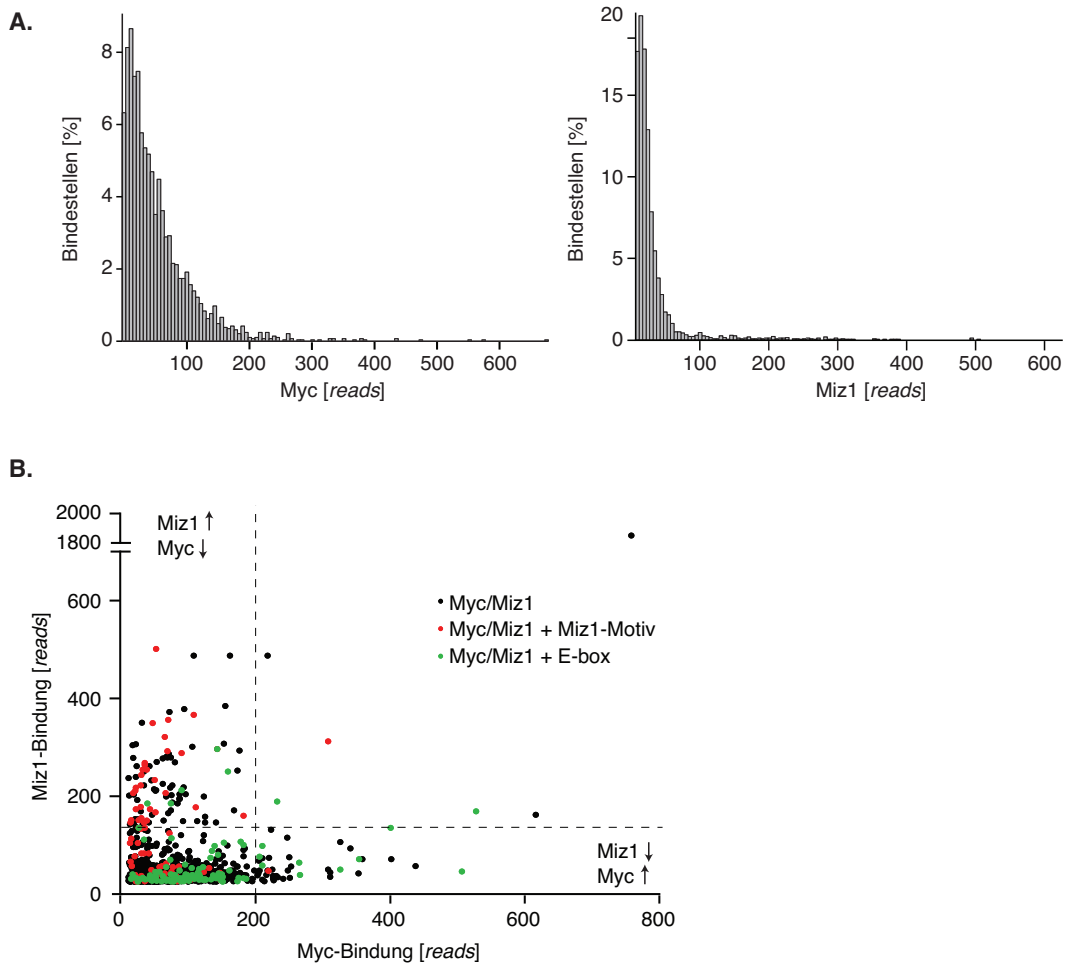


Abb. 4.10: Myc- und Miz1-Bindestärken definieren unterschiedliche Gruppen von Bindestellen.¹

(A) Verteilung der Myc- (links) und Miz1- (rechts) Bindestärken dargestellt in einem Histogramm mit einem Fenster von 6 reads.






(B) Verteilung der Myc und Miz1-Bindestärken der 1.000 stärksten Myc/Miz1-Bindestellen. Als Bindestärke dient die Anzahl der reads im Scheitelpunkt jedes peaks. Rote Punkte kennzeichnen Bindestellen mit einem Miz1-Motiv (n = 99), grüne Punkte sind Bindestellen mit einer Konsensus-E-Box (n = 141) im Myc-peak.

4.1.7.2. Identifikation von DNA-Bindemotiven in Myc/Miz1-Bindestellen

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, bindet Myc an E-Box-Sequenzen, wohingegen für Miz1 noch keine Konsensus-DNA-Bindesequenz bekannt ist. Es sollte nun untersucht werden, ob in Miz1 ↓/Myc ↑-Bindestellen E-Boxen angereichert sind im Vergleich zu Miz1 ↑/Myc ↓-Bindestellen. Dazu wurde mit Hilfe des Programms CEAS (*Cis-regulatory element annotation system*; Ji et al, 2006) die Region des Scheitelpunkts des Miz1-peaks +/- 100 bp auf bereits bekannte Transkriptionsfaktorbindestellen untersucht. Die Software vergleicht die Input-DNA-Sequenzen mit Gewichtsmatrizes von bekannten Bindesequenzen und berechnet einen p-Wert für die Anreicherung des jeweiligen Motivs. Eine Gewichtsmatrix

gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein bestimmtes Nukleotid an einer bestimmten Stelle eines DNA-Motivs zu erwarten ist. Die Ergebnisse für beide Gruppen von Bindestellen sind in Tabelle 4.2 dargestellt. Man findet sowohl für Miz1 ↓/Myc ↑- als auch für Miz1 ↑/Myc ↓- Bindestellen ähnliche Motive mit signifikanten p-Werten. Viele der gefundenen Gewichtsmatrizes stellen GC-reiche Regionen dar (Bindemotive für E2F1, ZF5, AP2α, Churchill und Ahr-ARNT). Für Myc ist bekannt, dass es mit E-Boxen in der Nähe von CpG- Inseln, also GC-reichen Regionen bindet (Fernandez et al, 2003). Des Weiteren findet das Programm auch eine Matrix mit einem E-Box-Motiv, welche in beiden Gruppen signifikant angereichert ist (p-Wert 4,1E-22 bzw. 2,8E-45). Zusammengefasst wurden die erwarteten Motive wie E-Boxen und GC-reiche Motive zwar gefunden, ein Unterschied zwischen Miz1 ↓/Myc ↑- und Miz1 ↑/Myc ↓-Bindestellen konnte auf diese Weise allerdings nicht nachgewiesen werden.

Motivname	Miz1 ↓/ Myc ↑	Miz1 ↑/ Myc ↓	Gewichtsmatrix des Motivs
M00428.E2F-1 M00940.E2F-1	3,8E-75	1,8E-29	
M00333.ZF5 M00716.ZF5	3,6E-69	1,1E-232	
M00098.Pax-2	9,1E-56	1,8E-123	
AP2alpha	6,5E-41	1,2E-83	
M00090.Abd-B	2,9E-39	3,6E-68	

M00328.Pax-8	1,4E-37	0	
M00986.Churchill	1,1E-35	5,1E-52	
Ahr-ARNT	1,5E-22	1,4E-24	
M00322.c-MycMax	4,1E-22	2,8E-45	
M00033.p300	6,0E-21	1,9E-38	

Tab. 4.2: Bindestellen der Miz1 ↓/Myc ↑- und Miz1 ↑/Myc ↓-Gruppe unterscheiden sich nicht bezüglich des Vorhandenseins bekannter Transkriptionsfaktor-Bindemotiven.

Bei einer CEAS-Analyse beider Gruppen wurden sehr ähnliche Motive signifikant angereichert gefunden. Viele Motive stellen erwartete Sequenzen wie E-Boxen oder GC-reiche Motive, dar. Für die Analyse wurde ein Bereich von +/-100 bp um das Maximum des Miz1-peaks verwendet.

Aus diesem Grund wurden mit einer deutlich stringenteren Methode nach Unterschieden in beiden Gruppen gesucht: eine *de novo*-Motivsuche mittels MEME (Bailey et al, 2009) sollte zeigen, ob in der Miz1 ↓/Myc ↑-Gruppe E-Boxen so stark angereichert sind, dass diese auch ohne vorgefertigte Matrix gefunden werden können. Des Weiteren sollte eine solche Analyse die Frage nach der bisher unbekanntenen Miz1-Konsensussequenz beantworten. In Abbildung 4.11 A sind die drei am stärksten angereicherten Motive der beiden Gruppen dargestellt. E-Boxen konnten in Miz1 ↓/Myc ↑-Bindestellen identifiziert werden. Außerdem findet man in dieser Gruppe Bindestellen für Sp1, einen Transkriptionsfaktor der durch Aktivierung und Repression von Zielgenen eine Vielzahl von zellulären Prozessen reguliert, sowie mit weniger signifikantem p-Wert Elk4, ein ETS-Transkriptionsfaktor.

Die *de novo*-Motivsuche der Miz1 ↑/Myc ↓-Bindestellen ergab mehrere, bisher unbekannte Motive, die sich sehr ähnlich sind. Offensichtlich ist die starke Konservierung von TC bzw. CT in einem Abstand von 3-7 Nukleotiden. Das am stärksten angereicherte Motiv ist mit 21 Nukleotiden vergleichsweise lang und zeigt, abgesehen von den TC/CT-Nukleotiden, nur eine schwache Konservierung. Dies kann die Interaktion mit einigen der 13 Zinkfinger von

Miz1 ermöglichen: es ist denkbar, dass ein Zinkfinger spezifisch mit den TC/CT-Nukleotiden interagiert. Die weiteren Zinkfinger winden sich um die DNA-Helix und können die nächste TC/CT-Interaktionsfläche erkennen. Das am stärksten angereicherte Motiv wird im weiteren Verlauf der Arbeit als Miz1-Motiv bezeichnet, alle weiteren Analysen beziehen sich auf diese Konsensus-Sequenz.

Die Lokalisation und statistisch signifikante Anreicherung der identifizierten Motive im Zentrum der *peaks* gibt einen Hinweis darauf, dass es sich um spezifische Bindemotive handelt (Abb. 4.11 B). Außerdem konnten sehr ähnliche Motive auch in anderen Zellen (MDA-MB231 und neuronalen Vorläuferzellen (NPCs) aus Mäusen) und unter Verwendung verschiedener Antikörper für die Chromatin-Immunpräzipitation (N-17, C-19, H-190) gefunden werden (Abb. 4.11 C). Mit Hilfe eines Programms zur Vorhersage der möglichen DNA-Bindesequenz von C₂H₂-Zinkfingern (Persikov et al., 2014) konnte eine DNA-Sequenz ermittelt werden, die partielle Ähnlichkeit mit dem durch MEME-Analyse identifizierten Miz1-Motiv hat (Abb. 4.11 D). Für diese Analyse wurde die Aminosäuresequenz der 13 Zinkfinger von Miz1 benutzt und mittels eines polynomischen SVM (*Support Vector Machine*, Stützvektormethode) -Algorithmus eine wahrscheinliche DNA-Bindesequenz vorhergesagt.

Betrachtet man nun die Verteilung von Miz1-Motiv und E-Box (CACGTG) im XY-Diagramm der Myc- und Miz1-Bindestärken (Abb. 4.10 B), erkennt man eine deutliche Abgrenzung: Bindestellen mit Miz1-Motiv befinden sich nicht in der Miz1 ↓/Myc ↑-Gruppe, während in Miz1 ↑/Myc ↓-Bindestellen kaum E-Boxen vorkommen. Des Weiteren gibt es kaum einen Überlapp zwischen Bindestellen mit E-Box und Miz1-Motiv.

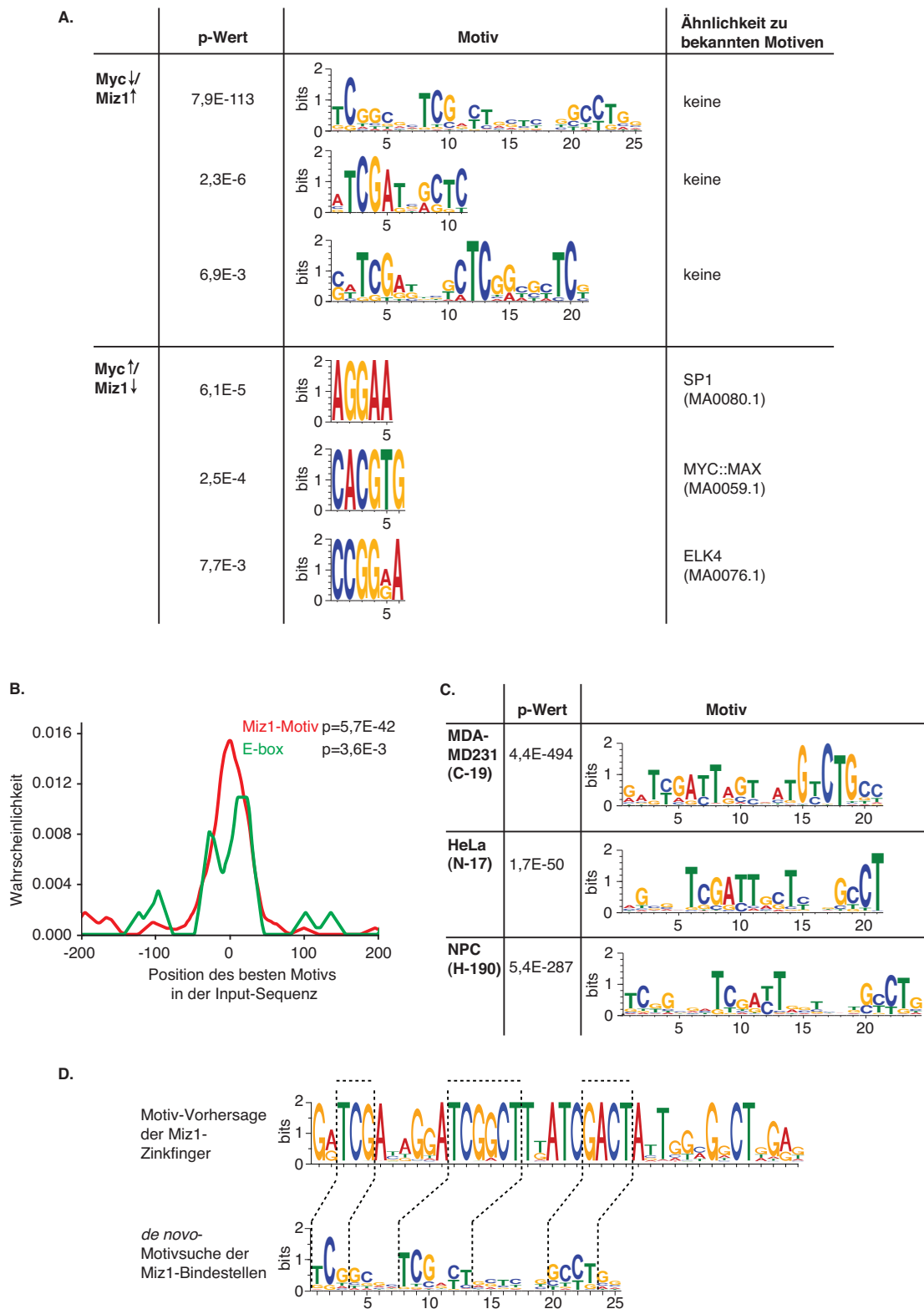


Abb. 4.11: Bioinformatische Identifizierung eines Miz1-DNA-Bindemotives.²

(A) Die drei am stärksten angereicherten Motive einer MEME *de novo*-Motivsuche für die Miz1 ↑/Myc ↓- und Miz1 ↓/Myc ↑-Bindestellen. Für die Analyse wurde ein Bereich von +/-50 bp um den *peak*-Scheitelpunkt gewählt; in Miz1 ↑/Myc ↓-Bindestellen wurde der Miz1-*peak* benutzt, in Miz1 ↓/Myc ↑-Bindestellen der Myc-*peak*. Der Vergleich zu bekannten Motiven wurde mit dem Programm TOMTOM durchgeführt, welches in der MEME Suite enthalten ist.

² Diese Abbildung wurde in ähnlicher Form in (Wolf et al, 2013) veröffentlicht (s. auch die folgenden Seiten).

(B) Zentrale Anreicherung des Miz1-Motivs und der E-Box in *peaks* der beiden untersuchten Gruppen. Es wurden die gleichen *peaks* verwendet wie in (A) beschrieben, allerdings wurde ein Abstand von ± 200 bp um den *peak*-Scheitelpunkt gewählt. Zur Erstellung wurde das Programm CentriMO (MEME Suite) benutzt; der p-Wert, der eine statistisch signifikante, zentrale Anreicherung anzeigt, wurde mit einem binominalen Test berechnet.

(C) Die MEME-Analyse weiterer Miz1-ChIP-Seq-Datensätze ergab ähnliche Motive im Vergleich zur Analyse in HeLa-Zellen. Für den Datensatz aus MDA-MB231-Zellen (Wolf et al, 2013) wurden alle *peaks* mit einer FDR $< 0,25$ benutzt ($n = 1.466$), für den HeLa-Datensatz mit Miz1 N-17-Antikörper wurde eine FDR $< 0,1$ verwendet und nach Promoter-Assoziation gefiltert ($n = 501$). Für die Analyse des NPC-Datensatzes (Wolf et al, 2013) wurden alle 213 identifizierten Bindestellen verwendet.

(D) Vergleich des mittels *de novo*-Motivsuche identifizierten Miz1-Motivs mit der durch die Analyse der Aminosäuresequenz der Zinkfinger von Miz1 ermittelten DNA-Bindesequenz. Ähnliche Bereiche sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Für die Analyse wurde ein polynomische SVM-Algorithmus benutzt.

4.1.7.3. Interaktion von Miz1 mit einer spezifischen DNA-Sequenz

Im Folgenden wurde mit einem *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) untersucht, ob Miz1 *in vitro* an das *in silico* gefundene Miz1-Motiv bindet. Da die in Miz1 enthaltene POZ-Domäne zur Tetramerisierung führt (Stead et al, 2007), war das aufgereinigte GST-Miz1-Fusionsprotein nicht in der Lage, in ein natives Polyacrylamidgel einzuwandern. Deshalb wurde ein GST-Miz1 Δ POZ-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und mit Hilfe einer GST-Matrix aufgereinigt. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurde ein Polyacrylamidgel mit Coomassie-Lösung gefärbt (Abb. 4.12 A). Um unspezifische Interaktionen mit dem Miz1-Motiv auszuschließen, wurde reines GST-Protein bakteriell exprimiert und aufgereinigt. Als Interaktionsmotiv wurde das Miz1-Motiv des *RSRC1*-Gens benutzt. GST-Miz1 Δ POZ zeigte im EMSA eine Bindung an das Miz1-Motiv, welches der Promoter des *RSRC1*-Gens aufweist (Abb. 4.12 B, Spur 3), während GST alleine nicht bindet (Spur 2). Die Affinität von Miz1 Δ POZ zu dem Miz1-Motiv ist deutlich höher als zu einer DNA-Sequenz mit E-Box-Motiv, da der Komplex mit einem nicht-markierten Miz1-Motiv kompetitiert werden kann (Spur 4), aber nicht mit einer nicht-markierten E-Box (Spur 5). Die Spezifität des DNA-Protein-Komplexes wurde mit einem *supershift assay* gezeigt: dabei wurde der Reaktionsansatz mit Miz1-Antikörpern inkubiert. Dadurch verschiebt sich die Bande des DNA/GST-Miz1 Δ POZ-Komplexes (Spur 7-8). Dagegen hat ein Kontrollantikörper, der ein N-terminales Epitop erkennt, welches im Miz1 Δ POZ-Fusionsprotein nicht vorhanden ist, keinen Einfluss auf die Bande (Spur 6). Des Weiteren wird die Bande nicht von IgG-Kontrollantikörpern verschiedener Spezies (Spur 10-12) verschoben. Unterhalb der markierten Bande ist eine weitere Bande sichtbar, welche mit nicht-markiertem Miz1-Motiv kompetitiert werden kann, aber nicht mit den C-terminalen Miz1-Antikörpern G-18 und C-19. Deshalb könnte es sich um ein C-terminal verkürztes GST-Miz1 Δ POZ-Protein handeln. Um dies zu untersuchen, wurde ein *supershift* mit einem GST-Antikörper durchgeführt, welcher die Protein-DNA-Komplexe beider Banden zerstört (Spur 9). Außerdem wurden beide Banden massenspektrometrisch

untersucht und festgestellt, dass sie GST-Miz1 Δ POZ-Protein enthalten (Abb. 4.12 C; die massenspektrometrische Analyse wurde von Dr. Werner Schmitz durchgeführt), während eine Kontrollregion zwischen beiden Banden kein GST-Miz1 Δ POZ-Peptid enthielt. Außerdem sind in der unteren Bande keine C-terminalen Peptide nachweisbar.

Neben dem Miz1-Motiv im *RSRC1*-Promoter konnte auch eine Interaktion von GST-Miz1 Δ POZ mit Miz1-Motiven aus anderen Promotoren gezeigt werden (Abb. 4.12 D). Die Inkubation des DNA/GST-Miz1 Δ POZ-Komplexes mit steigenden Mengen nicht-markierter DNA-Sequenzen der Gene *ZNHIT3* (Spur 6-9), *TSHZ1* (Spur 10-13), *PLA2G15* (Spur 14-17) und *SNX18* (Spur 18-21) zeigt eine graduelle Konkurrenz. Während *ZNHIT3* und *PLA2G15* gut kompetitierten und somit eine hohe Affinität zu GST-Miz1 Δ POZ zeigen, ist die Affinität von *TSHZ1* und *SNX18* geringer.

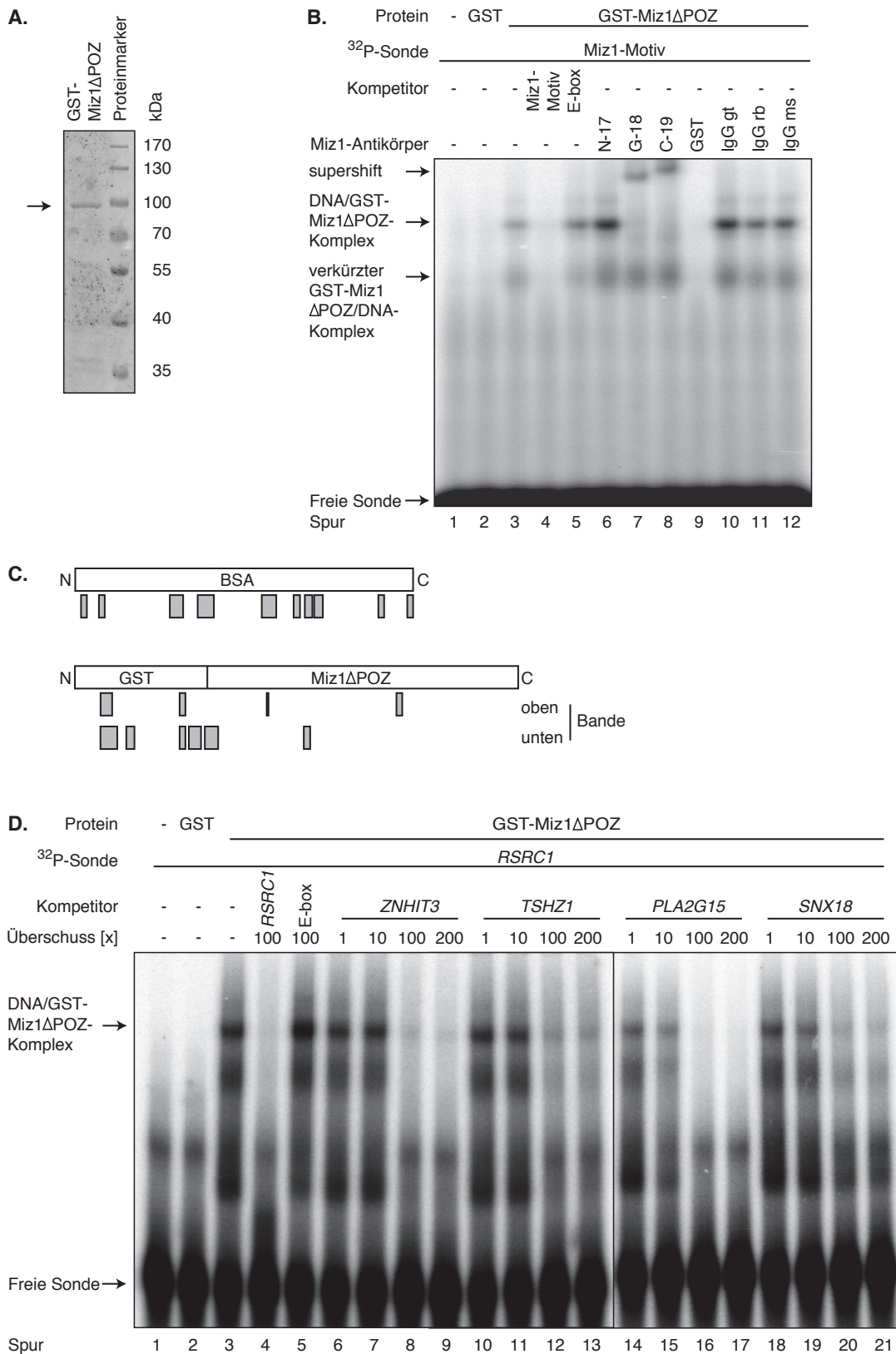


Abb. 4.12: Miz1ΔPOZ bindet *in vitro* an das Miz1-Motiv.²

(A) Coomassie-gefärbtes PAA-Gel von rekombinantem, aufgereinigtem GST-Miz1ΔPOZ-Fusionsprotein. Der Pfeil kennzeichnet die Bande des Fusionsproteins.

(B) Das Miz1-Motiv im *RSRC1*-Promoter bindet im EMSA an GST-Miz1 Δ POZ. Zur Kompetition mit nicht-markierter DNA wurde ein 100-facher Überschuss verwendet, für den *supershift* wurde jeweils 1 μ g Antikörper hinzugegeben. Die DNA/Protein-Komplexe wurden auf einem nativen 7,5 % PAA-Gel aufgetrennt.

(C) Sequenzabdeckung der massenspektrometrisch identifizierten Proteine (gefundene Peptide in grau). Als Kontrolle wurden 5 μ g BSA im nativen PAA-Gel aufgetrennt und die Trypsin-verdauten Peptide mittels FTICR-MS (Fouriertransformations-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometrie) identifiziert. Die beiden untersuchten EMSA-Banden enthielten Peptide, welche GST und Miz1 zugeordnet werden konnten. Proteine und gefundene Peptide sind maßstabsgetreu dargestellt. Das Experiment wurde von Dr. Werner Schmitz durchgeführt.

(D) GST-Miz1 Δ POZ bindet mit verschiedenen Affinitäten weitere Miz1-Motiv enthaltende Promotersequenzen (*ZNHIT3*, *TSHZ1*, *PLA2G15*, *SNX18*). Die Kompetition wurde mit nicht-markierter DNA, wie gekennzeichnet durchgeführt und die DNA-Protein-Komplexe auf einem nativen 7,5 %igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Um zu überprüfen, ob die Bindung von Miz1 spezifisch für die *in silico* identifizierte DNA-Sequenz ist, wurden Punktmutationen in das Miz1-Motiv im *RSRC1*-Promoter eingeführt (Abb. 4.13, rechts) und im EMSA untersucht, ob das Wildtyp-Motiv kompetitiert werden kann (Abb. 4.13, links). Die Kompetition des DNA/GST-Miz1 Δ POZ-Komplexes mit dem gleichen, nicht-markierten Oligo führt zu einem vollständigen Verschwinden der Bande (Spur 4), während das Oligo mit E-Box nicht kompetitiert (Spur 5). Oligos mit zwei („mut1“, Spur 6) bzw. 7 („mut2“, Spur 7) Mutationen in den am stärksten konservierten Bereichen des Motives zeigen nur eine sehr schwache Kompetition, das GST-Miz1 Δ POZ-Protein bindet folglich kaum an diese mutierten DNA-Sequenzen. Ein Oligo mit einer Mutation in einem nicht-konservierten Bereich („mut3“, Spur 8) kann die Bande aber vollständig kompetitieren, da dieses Nukleotid für die Interaktion von GST-Miz1 Δ POZ mit DNA nicht erforderlich ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass das bioinformatisch identifizierte Miz1-Motiv, welches auch in ChIP-Seq-Datensätzen von anderen Zelllinien und mit verschiedenen Antikörpern gefunden wurde, *in vitro* von Miz1 gebunden wird. Diese Bindung ist spezifisch, wie *supershift assays* und Mutationen des Motivs in konservierten Nukleotiden zeigten. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass in HEK293T-Zellen exprimiertes Miz1 *in vitro* an das Miz1-Motiv bindet (Wolf et al, 2013).

s

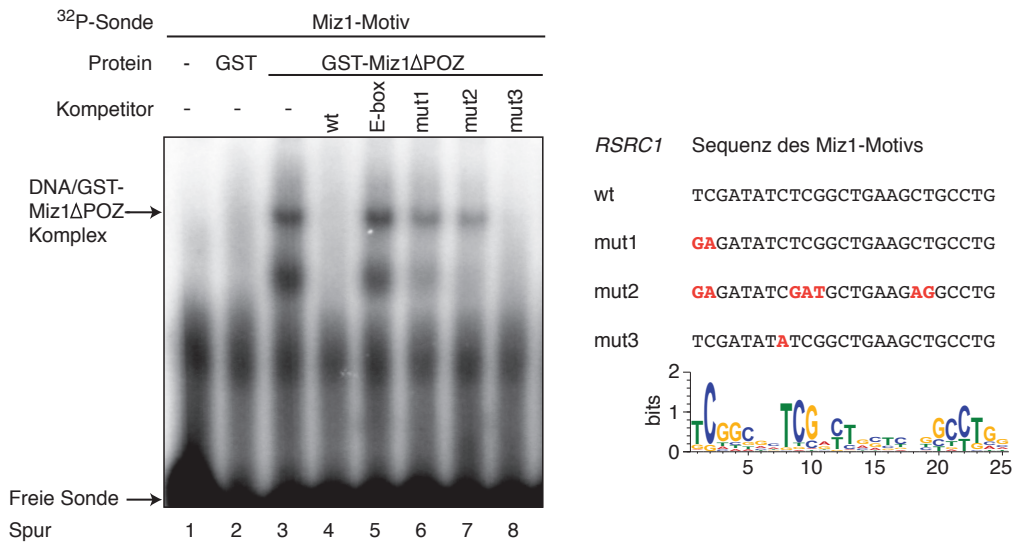


Abb. 4.13: Miz1 bindet spezifisch an das identifizierte Miz1-Motiv.²

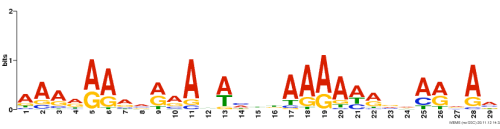
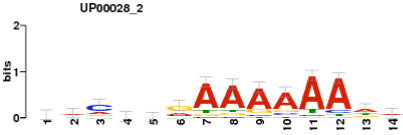
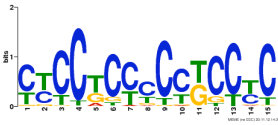
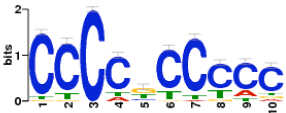
Rechts sind die Oligo-Sequenzen der mutierten Miz1-Motive sowie das mit MEME identifizierte Konsensus-Motiv dargestellt. Die linke Seite zeigt das Ergebnis des EMSAs. Die Kompetition wurde mit einem 35-fachen Überschuss an nicht-markiertem Oligonukleotid durchgeführt.


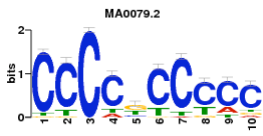



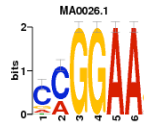
4.1.7.4. Myc/Miz1-Bindestellen ohne E-Box oder Miz1-Motiv

Trägt man in das XY-Diagramm der Myc/Miz1-Bindestärken Bindestellen mit Miz1-Motiv bzw. E-Box ein (Abb. 4.10 B, rote und grüne Punkte) sieht man eine asymmetrische Verteilung: in der Miz1 ↑/Myc ↓-Gruppe sind kaum Bindestellen mit E-Boxen zu finden, während die Bindestellen der Miz1 ↓/Myc ↑-Gruppe kein Miz1-Motiv enthalten. Auffällig ist, dass nur 24 % der Bindestellen eines der beiden Motive enthalten. Es ist bekannt, dass Myc auch E-Box-unabhängig an DNA bindet (Uribesalgo et al, 2011). Des Weiteren kann man vermuten, dass die DNA-Bindung von anderen Transkriptionsfaktoren vermittelt wird und Myc und Miz1 über Protein-Protein-Interaktionen rekrutiert werden. Um diese Hypothese zu prüfen wurden die 811 Myc/Miz1-Bindestellen ohne Miz1-Motiv oder E-Box isoliert und die jeweilige Promoterregion von -200 bp bis zur TSS mit MEME auf konservierte Motive untersucht. Tabelle 4.3 zeigt die am stärksten angereicherten Motive sowie deren Similarität zu bekannten Motiven. Das signifikanteste Motiv ist eine AT-reiche Region, die partielle Ähnlichkeit zum sekundären Bindemotiv des murinen Transkriptionsfaktors Tcfap2e (Transkriptionsfaktor AP-2ε) aufweist. Sekundäre Bindemotive unterscheiden sich von den primären Bindemotiven eines Transkriptionsfaktors. Es wird diskutiert, dass Transkriptionsfaktoren unterschiedliche Affinitäten zu den jeweiligen Motiven haben und somit die transkriptionelle Regulation unterschiedlich ist (Pfeifer et al, 1987). Außerdem

findet man die gleichzeitige Bindung an primäre und sekundäre Motive bei Transkriptionsfaktoren, die als Homodimere DNA binden (Wang et al, 2012). Die AP-2 Transkriptionsfaktoren sind stark konserviert zwischen *M. musculus* und *H. sapiens*. Außerdem konnte gezeigt werden, dass humanes AP-2 α mit Myc interagiert und die Myc-abhängige Transaktivierung von Zielgenen inhibiert (Gaubatz et al, 1995). Zwei weitere Motive sind ähnlich zu Sp1-Bindemotiven. Sp1 ist ein Transkriptionsfaktor, der in GC-reichen Promoter-Regionen bindet und als Aktivator oder Repressor fungieren kann. In Immunpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass Sp1 an Myc bindet und zur Repression von *CDKN1A* führt (Gartel et al, 2001). Das CCAAT-Motiv entspricht dem DNA-Bindemotiv von NF-YA (*nuclear transcription factor Y subunit A*), einer Untereinheit des heterotrimeren NF-Y-Komplexes. Die Untereinheiten NF-Y B und C vermitteln die Interaktion zu Kofaktoren und weiteren Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise Myc (Izumi et al, 2001; Taira et al, 1999). Ein weiteres stark konserviertes Motiv (CCGGAA) weist starke Ähnlichkeit zu Eip74EF (*Ecdyson-induced protein 74EF*) aus *D. melanogaster* auf. Dies ist ein Protein mit ETS-Domäne (*E-twenty six*), welche in allen Metazoen konserviert ist und an die Sequenz GGAA bindet. Humanes Elk3 und Etv3 enthalten ebenfalls ETS-Domänen und interagieren mit Myc (Alvarez et al, 1991; Agrawal et al, 2010).

Insgesamt ergab die Suche nach weiteren TF-Bindemotiven in Myc/Miz1-Bindestellen ohne Miz1-Motiv oder E-Box eine Vielzahl an möglichen Proteinen, die die Interaktion mit DNA ermöglichen und Myc rekrutieren können. Interaktionen von Miz1 mit einem der gefundenen Transkriptionsfaktoren sind momentan noch nicht bekannt, aber auf Grund der Zinkfinger, welche als Protein-Protein-Interaktionsdomänen fungieren, vorstellbar.

Motiv	p-Wert	Ähnlichkeit zu bekannten Motiven/p-Wert
	1,3E-50	Tcfap2e (sekundäres Motiv, Maus)/2,2E-5 
	8,3E-29	Sp1/6,9E-7 

	<p>2,6E-8</p>	<p>Sp1/6,8E-6</p> 
	<p>4,9E-8</p>	<p>NFYA/4,5E-5</p> 
	<p>6,8E-8</p>	<p>Eip74EF (Taufliege)/2,6E-6</p> 

Tab. 4.3: Myc/Miz1-Bindestellen ohne Miz1-Motiv oder E-Box.

Ergebnis einer MEME-Analyse der 811 Gene mit Myc/Miz1-Bindestellen im Promoter, welche weder Miz1-Motive noch E-Boxen besitzen. Es wurden aus den 2.879 Myc/Miz1-Bindestellen die 1.000 am stärksten Miz1-gebundenen Gene herausgefiltert und ein Bereich von +/-200 bp um die TSS untersucht. Dargestellt sind die signifikantesten Motive. Der Vergleich mit bekannten Transkriptionsfaktor-Bindemotiven mittels einer anschließenden TOMTOM-Analyse ist in der rechten Spalte gezeigt.

4.1.8. Das Miz1-Motiv definiert funktionell verschiedene Klassen von Genen

Im vorangegangenen Kapitel wurde die Identifizierung und Charakterisierung eines Miz1-Bindemotivs beschrieben. Im Folgenden wurde nun untersucht, ob es funktionelle Unterschiede in den direkten Myc- oder Miz1-Zielgenen gibt. Dazu wurden Myc/Miz1-Bindestellen in RNA-Polymerase II-Promotoren bestimmt und diejenigen Gene identifiziert, die entweder eine E-Box im Myc-*peak* aufweisen oder ein Miz1-Motiv im Miz1-*peak*. Anschließend wurde mit beiden Gengruppen eine Genverwandtschaftsanalyse mittels DAVID durchgeführt (Tab. 4.4). Die Myc/Miz1-Gene mit E-Boxen zeigten hierbei eine deutliche Anreicherung von Prozessen welche mit RNA-Biogenese, RNA-Prozessierung und Translation assoziiert sind. Außerdem befinden sich in dieser Gengruppe viele Gene, die für ribosomale Proteine kodieren. Gene mit einem Miz1-Motiv waren für keinen Prozess signifikant angereichert. Aus dieser Analyse lässt sich bereits eine eindeutige funktionelle Diskriminierung zwischen Genen mit E-Box und Miz1-Motiv belegen.

Gene ontology-Gruppe (E-Box-Gene)	q-Wert
ncRNA-metabolischer Prozess	3,3E-8
Ribosomenbiogenese	7,6E-8
ncRNA-Prozessierung	2,6E-7
rRNA-Prozessierung	3,2E-6
Biogenese des Ribonukleoproteinkomplexes	3,0E-6
rRNA-metabolischer Prozess	3,7E-6
RNA-Prozessierung	4,4E-6
Translation	1,7E-3
Nukleotidbindung	2,7E-3
RNA-Methyltransferase-Aktivität	1,3E-2

Tab. 4.4: E-Boxen und Miz1-Motive definieren funktionell verschiedene Klassen von Genen.

DAVID-Analyse von Genen, die in RNA-Polymerase II-Promotoren eine Myc/Miz1-Bindestelle enthalten sowie eine Konsensus-E-Box (n = 408). Gezeigt sind die 10 signifikantesten GO-Gruppen aus dem Bereich „Biologischer Prozess“. Eine Analyse Myc/Miz1-gebundener Gene mit Miz1-Motiv ergab keine signifikant angereicherten GO-Gruppen.

4.1.9. Regulation direkt gebundener Gene in B-Lymphozyten

Die im vorangehenden Abschnitt beschriebene Differenz zwischen E-Box- und Miz1-Motiv-enthaltenen Genen bezüglich der Funktion der gebundenen Gene, deutet auf eine ebenfalls unterschiedliche Regulation hin. Zu diesem Zweck wurden Expressionsdaten von aktivierten B-Lymphozyten (Nie et al, 2012) untersucht. Murine B-Lymphozyten wurden für 3,5 Stunden mit Lipopolysaccharid (LPS) aktiviert und anschließend mRNA für eine genomweite Microarray-Analyse isoliert (die Daten wurden zur Verfügung gestellt von Dr. David Levens). Anschließend wurden Gene herausgefiltert, die im HeLa-Datensatz eine Myc-Bindestelle in Promotoren besitzen und in Gruppen mit einer E-Box im Myc-peak oder einem Miz1-Motiv im Promoter unterteilt. Als Kontrollgruppe wurde eine zufällige Gruppe von 400 Genen verwendet. Abbildung 4.14 A zeigt die Verteilung der Expression der Gene der jeweiligen Gruppe in der Boxplot-Darstellung: Gene mit einer E-Box werden während der B-Zell-Stimulation signifikant aktiviert, während Gene mit Miz1-Motiv oder Gene der Kontrollgruppe keine Induktion der Expression zeigen. Die parallele Untersuchung der Myc-Besetzung nach B-Lymphozyten-Stimulation zeigt eine Rekrutierung von Myc an alle

untersuchten Promotoren (Abb. 4.14 B). Dieser Effekt ist spezifisch für Myc, da die Rekrutierung mit dem Myc-Max-Dimerisierungsinhibitor 10058-F4 abgeschwächt werden kann.

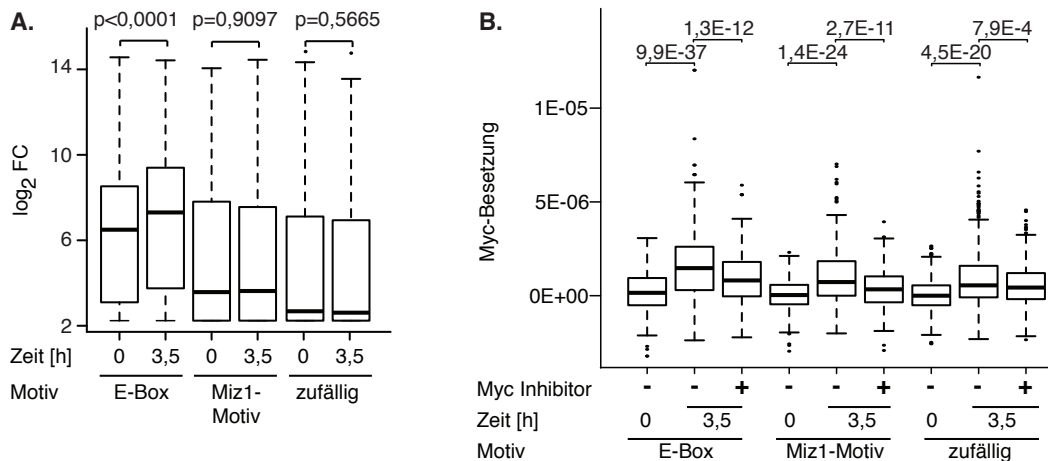


Abb. 4.14: Regulation von Genen mit E-Boxen und Miz1-Motiven.

(A) Microarray-Analyse Myc-gebundener Gene nach B-Lymphozyten-Aktivierung mittels Lipopolysaccharid für 3,5 Stunden ((Nie et al, 2012)). Es wurden Gene mit einer Myc-Bindestelle in HeLa-Zellen herausgefiltert und nach Konsensus-E-Boxen im Myc-peak (Scheitelpunkt des peaks +/-60 bp; n = 363) oder Miz1-Motiven im Promoter (n = 384) gesucht. Als Vergleichsgruppe dienten 400 zufällig ausgewählte Gene. p-Werte wurden mit einem Wilcoxon-Rangsummentest berechnet.

(B) Myc-Besetzung der in (A) untersuchten Gene in B-Lymphozyten nach LPS-Aktivierung für 3,5 Stunden. Für die Myc-Inhibition wurden Zellen mit 66,5 mM 10058-F4 für 2 Stunden vor der LPS-Stimulation behandelt. Es wurden reads im Bereich von +/-1 kb um eine RNA-Polymerase II-TSS gezählt, auf die Gesamt-read-Zahl normalisiert und die reads des entsprechenden Kontroll-IgG-ChIP-Seqs subtrahiert. p-Werte wurden mit einem Wilcoxon-Rangsummentest berechnet.

4.1.10. Vergleich der Miz1-Bindung in Tumor- und Nicht-Tumorzellen

Um zu untersuchen, ob das Miz1-Motiv auch in Nicht-Tumorzellen durch Miz1 gebunden ist, wurde ein Miz1-ChIP-Seq aus primären neuronalen Zellen (NPC) analysiert (Wolf et al, 2013). Zur Gewinnung der Zellen wurden Gehirne von Mäuseembryonen (E13,5) isoliert und *in vitro* zu Neurosphären kultiviert. Es wurden chromosomale Bereiche gesucht, die eine ähnliche Genverteilung im humanen und murinen Genom zeigen und die Bindeprofile von Myc und Miz1 in HeLa-Zellen und das Bindeprofil von Miz1 in NPCs dargestellt (Abb. 4.15). Es ist klar ersichtlich, dass Miz1 in primären Zellen an deutlich weniger Gene bindet als in HeLa-Zellen. Die Gene, die in NPCs besetzt sind, enthalten das Miz1-Motiv und sind vergleichbar stark gebunden wie in HeLa-Zellen, was zeigt, dass die Sensitivität beider Miz1-ChIP-Seq-Experimente vergleichbar ist. Somit ist ersichtlich, dass das Miz1-Motiv nicht nur in

verschiedenen Tumorzellen (HeLa, MDA-MB231) sondern auch in primären Zellen erkannt und gebunden wird. Die deutlich geringere Anzahl an Miz1-Bindestellen in primären Zellen kann durch die niedrigen Myc-Level in diesen Zellen erklärt werden: es wurde eine Myc-Chromatin-Immunpräzipitation durchgeführt, die anschließende Sequenzierung lieferte keine verwertbaren Ergebnisse (Wolf et al, 2013). Miz1 wird daher nicht von Myc zur DNA rekrutiert, somit konnten die schwachen Miz1-Bindestellen in diesem ChIP-Seq-Experiment nicht nachgewiesen werden.

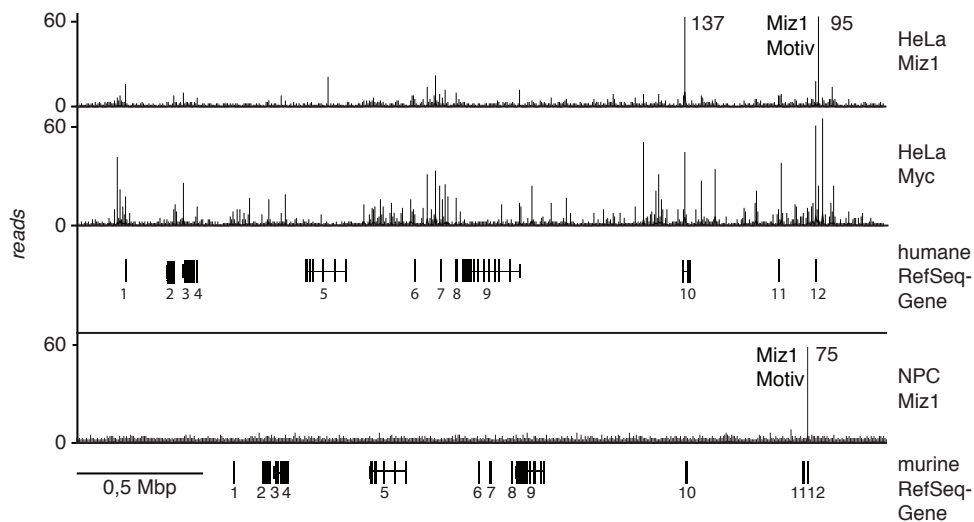


Abb. 4.15: Vergleich des Miz1-Bindeprofils in HeLa-Zellen und primären neuronalen Zellen.

Darstellung zweier synergistischer Bereiche des humanen Chromosoms 1 (151.600.000-155.200.000 bp) und des murinen Chromosoms 3 (87.600.000-91.400.000 bp), welche eine Assoziation von Miz1 an Gene mit Miz1-Motiv zeigt. Zahlen neben einem *peak* geben die Anzahl der *reads* des jeweiligen *peaks* an. Die Gene sind wie folgt bezeichnet: (1) *RPS27*, (2) *TPM3*, (3) *UBAP2L*, (4) *HAX1*, (5) *KCNN3*, (6) *THBS3*, (7) *SCAMP3*, (8) *FDPS*, (9) *ASH1L*, (10) *PMF1*, (11) *MRPL24*, (12) *HDGF*.

4.1.11. Rekrutierung von Miz1 an Gene mit E-Box

Aus Abbildung 4.10 B ist ersichtlich, dass es Bindestellen mit viel Miz1/wenig Myc und wenig Miz1/viel Myc gibt und diese Gruppen sich bezüglich des Vorhandenseins von DNA-Bindemotiven unterscheiden. Somit kann man vermuten, dass in der Miz1 ↑/Myc ↓-Gruppe Myc über Miz1 an die DNA rekrutiert wird und in der Miz1 ↓/Myc ↑-Gruppe Myc direkt an DNA bindet und Miz1 rekrutiert. Um diese Hypothese zu testen wurde Myc mittels einer shRNA in HeLa-Zellen lentiviral depletiert (Abb. 4.16 A, oben) und anschließend die Myc-Depletion auf Chromatinebene mit einem Myc-ChIP verifiziert (Abb. 4.16 A, unten). Hierfür wurden Primer für die TSS des Gens *FBXW8* verwendet, das eine Konsensus-E-Box besitzt und eine starke Myc-Bindung an der TSS aufweist, wobei eine Miz1-Bindestelle nicht

nachweisbar ist (siehe Abb. 4.2). Im Anschluss wurde das Chromatin mit Myc-, bzw. Miz1-Antikörpern immunpräzipitiert und die Bindung an verschiedene Gene mit qPCR untersucht. Zur Kontrolle möglicher unterschiedlicher Effizienzen bei der Immunpräzipitation von verschiedenen Chromatin-Proben wurde jedes Chromatin mit RNA-Polymerase II-Antikörper präzipitiert und die %-Input-Werte von Myc- und Miz1-ChIP relativ zur Polymerase dargestellt. Es wurden jeweils zwei Gene untersucht, die zum einen eine E-Box enthalten (*PPRC1* und *MACROD1*), zum anderen ein Miz1-Bindemotiv (*RSRC1* und *VAMP4*, Abb. 4.16 B). Man erkennt bei allen untersuchten Genen eine starke Abnahme der Myc-Bindung. Des Weiteren nimmt Miz1 sehr stark auf den E-Box-Genen ab, während Miz1 auf den Genen mit Miz1-Motiv annähernd unverändert bleibt. Auf den E-Box-Genen kann Miz1 nicht mehr binden, da Myc depletiert ist und somit kein Miz1 mehr an diese Gene rekrutiert werden kann. In den Promotoren von *RSRC1* und *VAMP4* befindet sich das Miz1-Motiv, welches direkt von Miz1 gebunden ist. Eine Myc-Depletion hat in dieser Gengruppe folglich keinen Einfluss auf die Miz1-Bindung. Unterstützt wird dieses Resultat von der Beobachtung, dass in U2OS-Osteosarkomzellen, welche ein Doxyzyklin-induzierbares *MYC*-Allel enthalten, nach Myc-Induktion eine Rekrutierung von Myc und auch Miz1 an E-Box-haltige Promotoren wie *PPRC1* stattfindet. Im Gegensatz dazu findet keine Rekrutierung von Miz1 an Promotoren statt, welche ein Miz1-Bindemotiv enthalten (Walz et al., 2014).

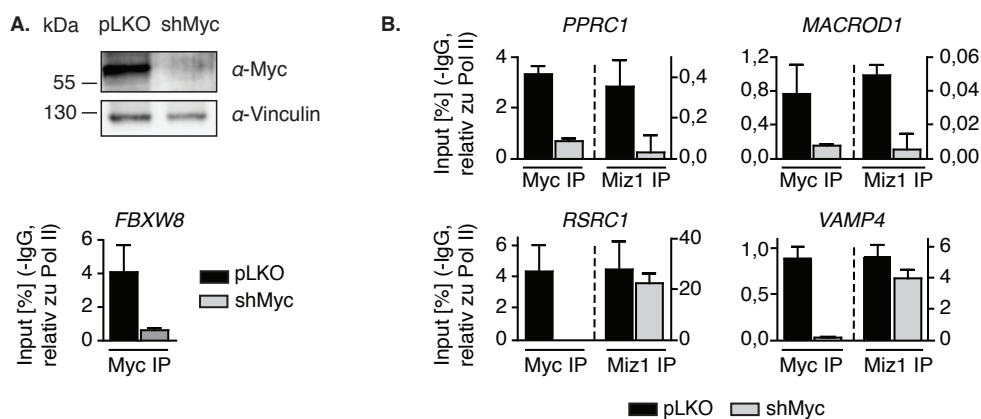


Abb. 4.16: Miz1 wird durch Myc an E-Box-Genen rekrutiert.¹

(A) Immunoblot einer lentiviralen Depletion von Myc in HeLa-Zellen mittels shRNA und einer Leervektor-Kontrolle (oben) und anschließende Chromatin-Immünpräzipitation zur Verifizierung der Depletionseffizienz von Chromatin-gebundenem Myc-Protein (unten). Von den %-Input-Werten wurden die IgG-Werte subtrahiert und zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Chromatin-Proben wurden die Werte auf einem RNA-Polymerase II-ChIP (Antikörperklon N-20) normalisiert.

(B) Myc- und Miz1-Chromatin-Immünpräzipitation nach lentiviraler Myc-Depletion. *PPRC1* und *MACROD1* enthalten Konsensus-E-Boxen im Promoter, *RSRC1* und *VAMP4* jeweils ein Miz1-Motiv. Von den %-Input-Werten wurden die IgG-Werte subtrahiert und zur besseren Vergleichbarkeit verschiedener Chromatin-Proben wurden die Werte auf einem RNA-Polymerase II-ChIP (Antikörperklon N-20) normalisiert.

4.2. Regulation Myc/Miz1-gebundener Gene

In den vorangegangenen Abschnitten wurde beschrieben, dass Myc und Miz1 hunderte von gemeinsamen Bindestellen im Genom von HeLa-Zellen haben. Die DNA-Bindung der beiden Proteine wird zum einen durch direkte Interaktion mit E-Box- und Miz1-Bindesequenzen ermöglicht und zum anderen durch indirekte Interaktionen. Im nächsten Schritt stellt sich die Frage, welche Konsequenzen die DNA-Bindung von Myc und Miz1 auf genregulatorischer Ebene haben. Zu diesem Zweck wurden genomweite Expressionsanalysen (Microarray) von Myc- bzw. Miz1-depletierten HeLa-Zellen durchgeführt. Ausgehend vom Modell der generellen Genaktivierung durch Myc (siehe Abschnitt 1.3.2), bei der in B-Lymphozyten nach Myc-Aktivierung sowohl Zellgröße als auch Gesamt-RNA- und mRNA-Level ansteigen, wurde im Vorfeld untersucht, ob HeLa-Zellen nach der Depletion mit shMyc kleiner werden und sich ihre RNA-Menge verringert. Nach der lentiviralen Infektion mit shMyc und Kontroll-shRNA (Abb. 4.17 A) wurde die Zellgröße unfixierter Zellen mit Hilfe des Vorwärtsstreulichts (*forward light scatter*, FSC) eines Durchflusszytometers (FACS) bestimmt (Abb. 4.17 C, das FACS wurde von Katrin Wiese durchgeführt). Der Graph der relativen Zellgröße verschiebt sich nach Myc-Depletion geringfügig nach links (Abb. 4.16 C, rechts), d. h. die Zellen sind minimal kleiner. Anschließend wurde Gesamt-RNA aus diesen Zellen isoliert und die Konzentration gemessen. Aus Abbildung 4.16 B ist ersichtlich, dass sich der RNA-Gehalt nach Myc-Depletion nicht signifikant ändert. Diese Resultate ermöglichen somit die Durchführung von genomweiten Expressionsanalysen, wobei es nicht von Bedeutung ist, ob die Normalisierung der Daten auf Zellzahl oder Gesamt-RNA erfolgt.

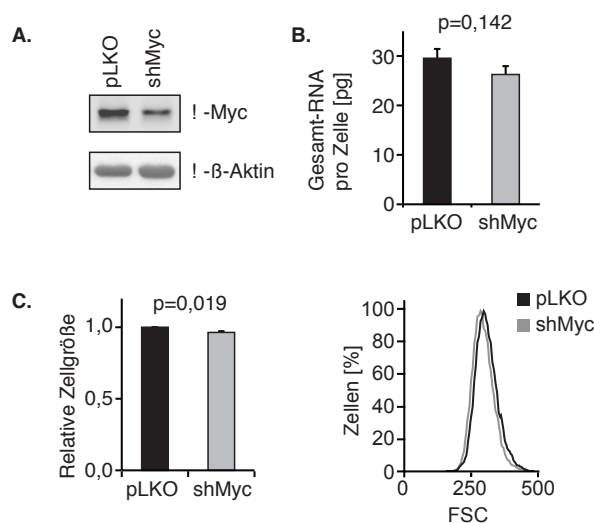


Abb. 4.17: Eine Depletion von Myc in HeLa-Zellen hat keinen Einfluss auf Zellgröße oder RNA-Gehalt.¹

(A) Repräsentatives Ergebnis eines Immunoblots (links) nach Myc-Depletion mit shRNA in HeLa-Zellen. Rechts sind die MYC-mRNA-Level dargestellt.

(B) Gesamt-RNA von Myc-depletierten HeLa-Zellen. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert mit Standardabweichung aus 3 unabhängigen biologischen Replikaten. Die p-Werte wurden mit Hilfe eines zweiseitigen, gepaarten t-Tests berechnet.

(C) Zellgröße nach Myc-Depletion in HeLa-Zellen ermittelt mit dem Durchflusszytometer (FACS). Gemessen wurden 3 biologische Replikate, der Balken gibt den Mittelwert sowie die Standardabweichung an (links). Der p-Wert wurde mit Hilfe eines zweiseitigen, gepaarten t-Tests berechnet. Rechts ist exemplarisch die Messung eines Replikates dargestellt (FSC *forward light scatter*). Die FACS-Messung wurde von Katrin Wiese durchgeführt.

4.2.1. Aktivierung durch Myc

Nach Depletion mit shMyc in HeLa-Zellen (Daten zur Verfügung gestellt von Dr. Elmar Wolf) wurden bei einem Schwellenwert von mehr als 1,5-facher Änderung im Vergleich zur Kontrolle 649 Gene herunterreguliert und 608 Gene hochreguliert. Um zu überprüfen ob die Myc-Depletion in HeLa-Zellen ein ähnliches Expressionsprofil zeigt wie in Gensets Myc-aktiverter Gene, wurde eine *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) durchgeführt, welche die Expressionsdaten aus diesem Experiment mit Gensets von publizierten Expressionsdaten vergleicht. Tabelle 4.5 (links) zeigt ausgewählte Gensets aus der C2- und C6-Gruppe der MSigDB (*Molecular Signature Database*), welche Myc-aktivierte Gene aus verschiedenen biologischen Systemen (P493-6 B-Lymphozyten, embryonale Stammzellen, primäre Brustepithelzellen) enthalten. Die Gene dieser Gensets sind nach Myc-Depletion in HeLa-Zellen stark herunterreguliert, d. h. es handelt sich um Myc-aktivierte Gene. Somit zeigt die Microarrayanalyse die nach einer Myc-Depletion zu erwartende Signatur.

Genset	Herunterreguliert nach Myc-Depletion			Herunterreguliert nach Miz1-Depletion		
	NES	p-Wert	q-Wert	NES	p-Wert	q-Wert
„Schuhmacher Myc targets up“	-2,53	<0,001	<0,001	-0,93	0,552	0,829
„Schlosser Myc targets up“	-2,61	<0,001	0,008	-0,88	0,705	0,877
„Dang Myc targets up“	-2,05	<0,001	0,008	-0,98	0,514	0,762
„Benporath Myc targets with E-box“	-1,77	<0,001	0,090	-1,16	0,134	0,557
„Myc V1 up“	-2,60	<0,001	<0,001	0,94	0,615	0,759

Tab. 4.5: GSEA-Analyse nach Myc- bzw. Miz1-Depletion in HeLa-Zellen.¹

Dargestellt sind Myc-assoziierte Gensets, welche Myc-aktivierte Gene enthalten und signifikant angereichert sind (Schuhmacher et al, 2001; Schlosser et al, 2005; Zeller et al, 2003; Ben-Porath et al, 2008; Bild et al, 2006). Rechts sind die gleichen Gensets nach Miz1-Depletion dargestellt. Der NES (*normalised enrichment score*, normalisierter Anreicherungs Wert) gibt den Grad der Überrepräsentation an und kann, da er auf die Gensetgröße normalisiert ist, auch zum Vergleich verschiedener Analysen dienen.

Sucht man nach Genen, welche eine Myc/Miz1-Bindestelle in der Nähe des Transkriptionsstarts aufweisen und stellt die Expression in einem Boxplot dar (Abb. 4.18), sieht man, dass diese direkt gebundenen Gene keine generelle Tendenz zur Hoch- oder Herunterregulation zeigen. Filtert man jedoch nach Genen, die zusätzlich eine Konsensus-E-Box im Myc-*peak* enthalten, ist zu erkennen, dass diese Gene von Myc aktiviert werden ($p = 0,0236$; $n = 37$). Im Gegensatz dazu werden Gene mit einem Miz1-Motiv nicht durch Myc aktiviert ($p = 0,2778$; $n = 84$).

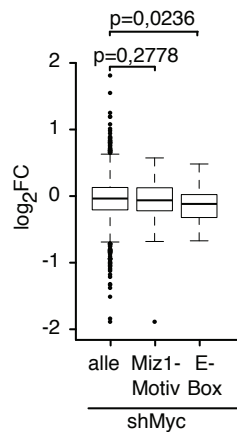


Abb. 4.18: Regulation direkt gebundener Gene mit DNA-Bindemotiven.

Darstellung der Regulation nach Myc-Depletion in HeLa-Zellen mittels eines Boxplots. Die Gene wurden nach dem Vorhandensein von annotierten und überlappenden Myc/Miz1-Bindestellen im Promoter gefiltert. Außerdem wurde nach Anwesenheit einer E-Box (CACGTG) im Myc-*peak* oder eines Miz1-Bindemotivs im Promoter gefiltert. Die p-Werte wurden mit einem ungepaarten, einseitigen Mann-Whitney-U-Test berechnet.

4.2.2. Vergleichende Analyse von Myc-depletierten Zellen mit Myc-abhängigen Tumoren

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob das Expressionsprofil nach Myc-Depletion einer onkogenen Myc-Signatur in humanen Tumoren gleicht. Hierfür wurde überprüft, ob das Expressionsprofil nach Myc-Depletion in HeLa-Zellen für eine Unterscheidung von Expressionsprofilen aus *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen und nicht *MYCN*-amplifizierten Tumoren dienen kann. Für diese Klassifizierung wurde ein linearer SVM-Algorithmus benutzt (diese Analyse wurde von Dr. Frederik Roels durchgeführt). In einem ersten Schritt wurden die nach Myc-Depletion regulierten Gene aus 96 Expressionsprofilen (je 48 aus *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen und normalem neuronalen Gewebe) herausgefiltert und als Trainingsdatensätze verwendet. Die berechnete Hyperebene diente dann zur Klassifizierung von 38 Datensätzen (zu gleichen Teilen normales Gewebe und *MYCN*-amplifizierte Neuroblastome), welche zuvor nach regulierten Genen nach Myc-

Depletion gefiltert wurden. Hierbei konnten 37 von 38 Proben richtig klassifiziert werden, was einer Genauigkeit von 97 % entspricht (Abb. 4.19 A). Der Korrelationskoeffizient nach Matthews (MCC) verdeutlicht dabei die Exaktheit der Korrelation und sollte in der Nähe von 1 liegen. Des Weiteren wurde mit der gleichen Methode untersucht, ob die regulierten Gene aus HeLa-Zellen auch das Überleben von Tumorpatienten mit *MYCN*-amplifizierten Neuroblastomen prognostizieren können. Mit Hilfe der nach Myc-Depletion regulierten Gene konnten 75,5 % (40/53) der Patienten korrekt klassifiziert werden.

Außerdem wurden die Expressionsdaten mit Expressionsdaten von 24 Zelllinien aus kleinzelligen Bronchialkarzinomen mit Hilfe einer GSEA verglichen (Abb. 4.19 B). 13 dieser Zelllinien weisen eine chromosomale *MYC*-Amplifikation auf. Die in diesen Zellen aktivierten Gene werden in diesem Genset zusammengefasst. Die GSEA-Analyse zeigt, dass die in *MYC*-amplifizierten Bronchialkarzinomen aktivierten Gene nach Myc-Depletion herunterreguliert werden, d. h. sie sind Myc-aktivierte Gene. Somit weisen die Myc-Depletionsdaten aus HeLa-Zellen eine deutliche Korrelation zu *MYC*-amplifizierten Bronchialkarzinomen auf.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die aus HeLa-Zellen gewonnenen Expressionsdaten nach Myc-Depletion einer onkogenen Myc-Signatur aus verschiedenen humanen Tumoren gleichen.

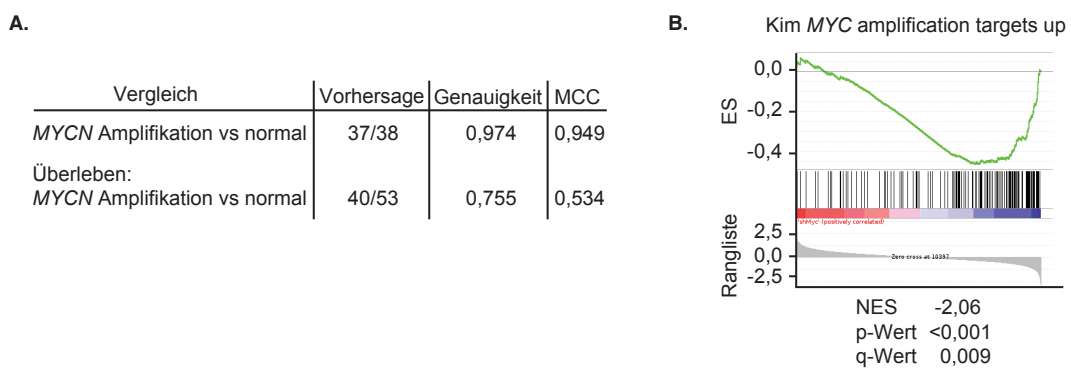


Abb. 4.19: Myc-depletierte HeLa-Zellen zeigen Merkmale *MYCN*-amplifizierter Tumore.¹

(A) Klassifizierung humaner *MYCN*-amplifizierter Neuroblastome nach dem Genexpressionsprofil Myc-depletierter HeLa-Zellen. Es wurde ein linearer SVM-Algorithmus benutzt, die Genauigkeit gibt den prozentualen Anteil der richtigen Vorhersagen an. Der Korrelationskoeffizient nach Matthews (MCC) ist ein Maß für die Exaktheit der Klassifizierung.

(B) Anreicherungsplot einer GSEA-Analyse eines Gensets aus 24 Zelllinien, die aus kleinzelligen Bronchialkarzinomen mit *MYC*-Amplifikation stammen (Kim et al, 2006). Gene, die nach Myc-Depletion herunterreguliert werden, sind in diesen Zelllinien aktiviert. ES: *enrichment score*; NES: *normalised enrichment score*.

4.2.3. Aktivierung durch Miz1

Wie in der Einleitung beschrieben, gibt es Gene, welche durch Miz1 aktiviert werden (z. B. Zellzyklusinhibitoren). Um weitere Miz1-aktivierte Gene zu finden, wurde neben dem bereits besprochenen Myc-Depletionsexperiment (Abb. 4.17 und 4.18) auch Miz1 mittels shRNA in HeLa-Zellen depletiert (Abb. 4.20 A) und RNA für eine Microarray-Analyse isoliert (Daten wurden zur Verfügung gestellt von Dr. Elmar Wolf). Hierbei wurden bei einem Schwellenwert von 1,5-facher Änderung im Vergleich zur Kontrolle 394 Gene herunterreguliert und 243 Gene hochreguliert. Eine GSEA-Analyse mit Gensets Myc-aktivierter Gene zeigt, dass die durch Myc induzierten Gene nicht durch Miz1 aktiviert werden (Tab. 4.5). Extrahiert man allerdings Gene, welche eine Myc/Miz1-Bindestelle sowie ein Miz1-Motiv im Promoter enthalten, sieht man, dass diese Gene durch Miz1 aktiviert werden (Abb. 4.20 B; $p = 0,0001$; $n = 85$). Direkte Myc/Miz1-Bindestellen mit E-Boxen werden nicht durch Miz1 aktiviert ($p = 0,2083$; $n = 37$).

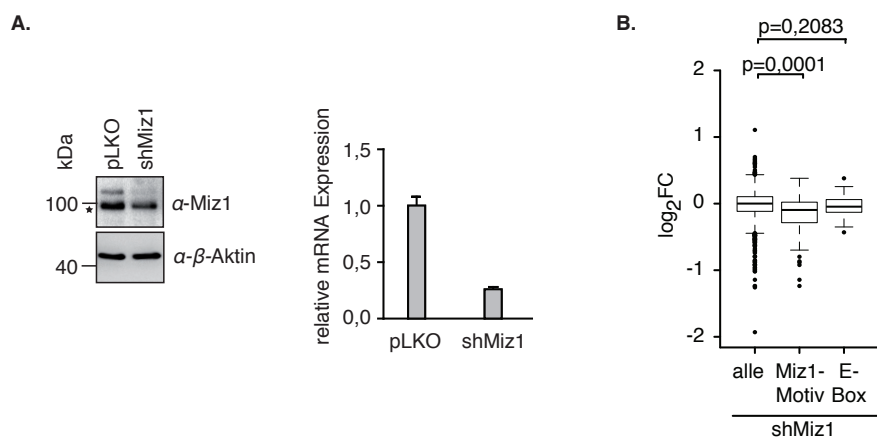


Abb. 4.20: Regulation direkt gebundener Gene mit DNA-Bindemotiven.

(A) Depletion von Miz1 mittels shRNA. Links ist die Depletion auf Proteinebene im Immunoblot dargestellt, zur Kontrolle der Ladung wurde β -Aktin benutzt. Rechts ist das Ergebnis einer qRT-PCR der *MIZ1*-mRNA gezeigt. Zur Normalisierung wurde β -2-Mikroglobulin verwendet. ★ kennzeichnet eine unspezifische Bande des Miz1-Antikörpers. Dieses Experiment wurde von Dr. Elmar Wolf durchgeführt.

(B) Darstellung der Regulation nach Miz1-Depletion in HeLa-Zellen mittels eines Boxplots. Die Gene wurden nach dem Vorhandensein von annotierten und überlappenden Myc/Miz1-Bindestellen im Promoter gefiltert. Außerdem wurde nach Anwesenheit einer E-Box (CACGTG) im *Myc-peak* oder eines Miz1-Bindemotives im Promoter gefiltert. Die p-Werte wurden mit einem ungepaarten, einseitigen Mann-Whitney-U-Test berechnet.

4.2.4. Myc/Miz1-abhängige Repression

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten die Genaktivierung durch Myc bzw. Miz1 besprochen wurde, stellte sich die Frage nach der Repression durch Myc und Miz1. Für einige wenige Gene (z. B. *CDKN1A*, *CDKN2B*) ist bekannt, dass sie durch Miz1 aktiviert

werden können. Die Repression dieser Gene erfolgt durch einen heterotrimeren Myc/Max/Miz1-Komplex. Eine GSEA-Analyse zeigt, dass die nach einer Myc-Depletion hochregulierten Gene angereichert sind für Gensets Myc-reprimierter Gene (Tab. 4.6, links), d. h. in HeLa-Zellen werden Gene reprimiert, die in anderen biologischen Zusammenhängen ebenfalls als Myc-reprimierte Zielgene identifiziert wurden. Diese Gensets sind nach Miz1-Depletion in den reprimierten Genen mit einem statistisch signifikanten p-Wert ($p < 0,05$) angereichert (Tab. 4.6, rechts). Folglich aktiviert Miz1 einen Teil der durch Myc reprimierten Gene dieser Gensets. Der q-Wert, der für multiples Testen korrigiert, ist allerdings nicht signifikant. Dies liegt zum einen daran, dass nach Miz1-Depletion wenig Gene reguliert sind (bei einem *fold change* von +/-1,5 637 Gene nach Miz1-Depletion, aber 1.257 Gene nach Myc-Depletion) und zum anderen sind die Änderungen der Expression gering. Das GSEA-Resultat legt nahe, dass es eine Gruppe von Genen gibt, die von Myc reprimiert und von Miz1 aktiviert werden, was konsistent mit dem bisher beschriebenen Modell der Repression für verschiedene Zellzyklusinhibitoren ist.

Genset	Hochreguliert nach Myc-Depletion			Herunterreguliert nach Miz1-Depletion		
	NES	p-Wert	q-Wert	NES	p-Wert	q-Wert
„Kim MYCN amplification targets down“	1,76	<0,001	0,057	-1,68	0,003	0,237
„Dang regulated by Myc down“	2,12	<0,001	0,002	-1,29	0,047	0,447
„Acosta proliferation independent Myc targets down“	2,11	<0,001	0,001	-1,35	0,046	0,263
„Myc V1 down“	1,98	<0,001	0,001	-1,31	0,047	0,283

Tab. 4.6: GSEA-Analyse Myc-reprimierter Gensets nach Myc- bzw. Miz1-Depletion in HeLa-Zellen. ¹

Dargestellt sind Gensets Myc-reprimierter Gene einer GSEA-Analyse mit signifikantem p-Wert nach Myc- bzw. Miz1-Depletion (Acosta et al, 2008; Bild et al, 2006; Kim et al, 2006; Zeller et al, 2003). NES: *normalised enrichment score*

Die GSEA-Analyse zeigt, dass es sich bei den auf diese Weise identifizierten Genen um eine Subgruppe aller Myc-reprimierten Gene handelt. Zudem ist die Miz1-Depletion in HeLa-Zellen relativ ineffizient: in dem beschriebenen Experiment konnte Miz1 zu 75 % depletiert werden. Es ist möglich, dass die verbleibenden 25 % für die Aufrechterhaltung der Funktion in HeLa-Zellen ausreichend sind. Aus diesem Grund wurde für weitere Analysen auf einen Datensatz von Kleinhirnen aus Mäusen zurückgegriffen (Wolf et al, 2013). Diese exprimieren

eine verkürzte Form von Miz1 ohne POZ-Domäne (Miz1 Δ POZ; siehe Abb. 1.2). Aus Abbildung 4.10 B und 4.20 B ist ersichtlich, dass die stark von Miz1 gebundenen Gene Miz1-Motive enthalten und durch Miz1 aktiviert werden. Des Weiteren enthalten stark Myc-gebundene Gene E-Boxen und werden von Myc aktiviert. Dadurch stellt sich die Frage, wie Gene reguliert werden, die gleich viel Myc und Miz1 gebunden haben. Hierfür wurde für alle annotierten und überlappenden Myc- und Miz1-*peaks* das Verhältnis von Myc- zu Miz1-*reads* in einem *peak* sowie die Summe der *reads* berechnet. In einem XY-Plot wurden diese Gene eingetragen und entsprechend ihrer Regulation farbig dargestellt (Abb. 4.21 A). Myc-aktivierte Gene (rote Punkte) sind nach Depletion in HeLa-Zellen herunterreguliert und haben deutlich mehr Myc als Miz1 gebunden. Deshalb akkumulieren sie im rechten Bereich der Graphik. Miz1-aktivierte Gene (blaue Punkte) aus Kleinhirnen von Miz1 Δ POZ-Mäusen binden deutlich mehr Miz1 als Myc und sind im linken Bereich des Plots konzentriert. Im Gegensatz dazu sind Myc-reprimierte Gene (grüne Punkte) in einem Bereich angereichert, bei dem etwa gleiche Mengen von Myc und Miz1 gebunden sind (Verhältnis Myc zu Miz1 etwa 1). Verdeutlicht wird dies in der Quantifizierung (Abb. 4.21 B), dargestellt mit verschiedenen Grenzen für das Myc/Miz1-Verhältnis. Ein Chi²-Test zeigt, dass die Verteilung zwischen allen Gruppen signifikant unterschiedlich ist.

Dass die Repression Miz1-abhängig ist, wird unterstützt von der Beobachtung, dass humane Osteosarkomzellen, welche eine Myc-Mutante (MycV493D, Herold et al, 2002) exprimieren, die nicht mehr an Miz1 bindet, Myc-gebundene Gene deutlich schwächer reprimieren als Myc-Wildtyp-exprimierende Zellen (Walz et al., 2014). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Myc und Miz1 in ungefähr equimolaren Mengen an Promotoren gebunden sein müssen, um transkriptionell zu reprimieren und dass die Myc-vermittelte Repression Miz1-abhängig ist.

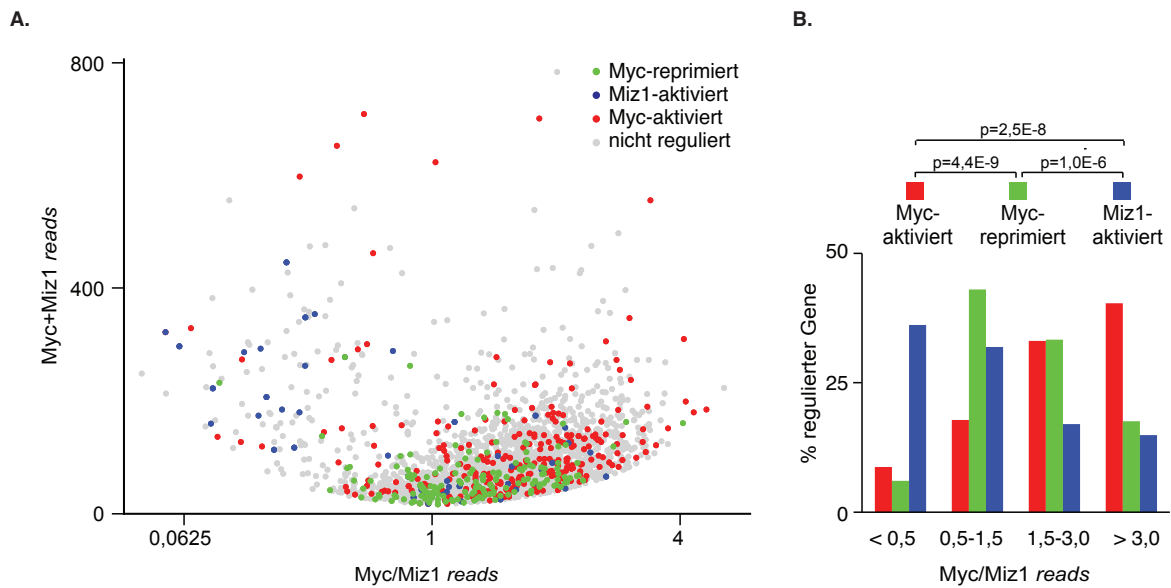


Abb. 4.21: Die Myc/Miz1-vermittelte Repression ist abhängig von der gebundenen Protein-Menge.¹

(A) XY-Plot von 2.879 überlappenden Myc/Miz1-peaks. Auf der x-Achse wurde das Verhältnis von Myc zu Miz1 reads aufgetragen, auf der y-Achse die Summe der reads. Rote und grüne Punkte kennzeichnen eine Regulation nach Myc-Depletion in HeLa-Zellen von \log_2FC (fold change) $\pm 0,38$. Die blauen Punkte geben die Regulation in Miz1 Δ POZ-Mäusen (\log_2FC $\pm 0,38$) an.

(B) Quantifizierung des in (A) dargestellten Diagramms in den angegebenen Grenzen für das Myc/Miz1-Verhältnis. Die p-Werte wurden mittels eines χ^2 -Tests in einer 4x2-Tabelle berechnet.

5. Diskussion

Das Proto-Onkoprotein Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der in einer Vielzahl humaner Tumore dereguliert ist. Daraus kann unter anderem eine Deregulation verschiedener zellulärer Stoffwechselwege, eine Erhöhung der Translation und eine gesteigerte Proliferation resultieren wodurch das Tumorwachstum begünstigt wird. Neben dem aktivierenden Myc/Max-Komplex existiert ein heterotrimerer Myc/Max/Miz1-Komplex, der bestimmte Zielgene, wie Zellzyklusinhibitoren, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionsproteine, reprimiert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen des Bindeverhaltens des Myc/Max/Miz1-Komplexes und des daraus folgenden Einflusses auf die transkriptionelle Genregulation könnten zu einem besseren Verständnis der Myc-abhängigen Genexpression in Tumorzellen führen.

5.1. Charakterisierung der Myc- und Miz1-Bindestellen in einer humanen Tumorzelllinie

5.1.1. Vergleich mit publizierten ChIP-Seq-Daten und bekannten Myc- und Miz1-Zielgenen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNA-Bindung von Myc sowie dessen Partnerproteins Miz1 in einer humanen Zervixkarzinomzelllinie genomweit untersucht. Hierfür wurden Chromatin-Immunpräzipitationen von endogenem Myc und Miz1 mit einer anschließenden Hochdurchsatzsequenzierung durchgeführt. Die Auswertung des Myc-ChIP-Seq-Datensatzes ergab 30.487 Bindestellen im humanen Genom, von denen 7.225 in Promotoren von RNA-Polymerase II-transkribierten Genen liegen (Abb. 4.4 A). Die große Anzahl an Bindestellen ist durch die transformierte Situation in HeLa-Zellen, die auch durch eine erhöhte Expression des Onkoproteins Myc charakterisiert ist, zu erklären: primäre neuronale Zellen (NPCs) enthalten beispielsweise kaum Myc-Protein wodurch es nicht möglich ist, einen Myc-ChIP-Seq in diesen Zellen durchzuführen (Wolf et al, 2013). In U2OS-Zellen hingegen, die ein induzierbares Myc-Konstrukt enthalten, erhöht sich die Anzahl der Bindestellen nach Doxyzyklin-Induktion von 20.014 auf 45.645 bei einer Verzehnfachung der Myc-Protein-Menge (Walz et al., 2014). Somit scheint die Affinität von Myc proportional zur Anzahl der identifizierten DNA-Bindestellen zu sein. Zu den im ChIP-Seq in HeLa-Zellen gebundenen Genen gehören eine Vielzahl bereits bekannter Myc-Zielgene wie *ODC1*, *NCL* und *CCND2*. Des Weiteren konnten 68 % (758/1.111, Bindestellen in +/-5 kb relative zur TSS; p-Wert = 1,6E-172) der in der „Myc target gene database“ (Zeller et al, 2003) enthaltenen Gene mit Hilfe des ChIP-Seqs identifiziert werden.

Die Zielgene des Zinkfingerproteins Miz1 sind bisher weit weniger detailliert untersucht worden. So sind bisher lediglich die Zellzyklusinhibitoren p15^{Ink4B} und p21^{Cip1} und an der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion beteiligte Proteine als transkriptionelle Zielgene des Myc/Miz1-Komplexes bekannt (Staller et al, 2001; Seoane et al, 2002; Gebhardt et al, 2006; Herkert et al, 2010). Der Miz1-ChIP-Seq ergab 6.086 Bindestellen im Genom, von denen 3.270 Promoter-assoziiert vorliegen. In diesem Datensatz konnten die bekannten Miz1-Zielgene identifiziert werden (Abb. 4.1 A, B). Dabei ist anzumerken, dass diese Gene nur schwach durch Miz1 und Myc gebunden sind. Im Gegensatz dazu gibt es eine Gruppe von Genen, die sehr stark Miz1-gebunden ist und im weiteren Verlauf näher untersucht wurde (siehe Abschnitt 5.1.3).

5.1.2. Myc bindet an Zielgene aller drei RNA-Polymerasen

Neben RNA-Polymerase II-transkribierten Genen konnte für Myc bereits gezeigt werden, dass auch Gene, welche durch andere RNA-Polymerasen transkribiert werden von Myc gebunden und reguliert werden (Gomez-Roman et al, 2003; Felton-Edkins et al, 2003; Poortinga et al, 2004; Grandori et al, 2005; Arabi et al, 2005). Die Analyse der ChIP-Seq-Daten in HeLa-Zellen verdeutlichte, dass Myc Gene bindet, welche durch alle RNA-Polymerasen transkribiert werden (Abb. 4.7 und 4.8). Miz1 hingegen bindet zwar neben RNA-Polymerase II-transkribierten Genen auch tRNA-Gene, die durch RNA-Polymerase III transkribiert werden, nicht aber RNA-Polymerase I-Gene wie die 45S-prä-rRNA (Tab. 5.1). Die Interaktion von Myc mit dem rDNA-Cluster konnte bisher lediglich nach Myc-Induktion, nicht aber von endogenem Myc nachgewiesen werden (Grandori et al, 2005; Arabi et al, 2005). Diese DNA-Bindung von endogenem Myc konnte nun hier in HeLa-Zellen gezeigt werden, obgleich die Besetzung nur schwach ausgeprägt war (Abb. 4.8). Die Bindung von Myc an tRNA- und rRNA-Gene zeigt den bereits bekannten Einfluss, den Myc auf das Zellwachstum hat, indem Gene transkriptionell aktiviert werden, die mit Metabolismus, Translation und Proliferation in Zusammenhang stehen (Dang et al, 2006). Damit korreliert eine funktionelle Analyse der im Myc-ChIP-Seq gebundenen Gene mit E-Boxen, mit der ebenfalls eine starke Assoziation mit translationalen Prozessen, RNA-Biogenese und -Prozessierung nachgewiesen werden konnte (Tab. 4.4).

Enhancer-Bereiche, welche üblicherweise mehrere Kilobasen von der TSS entfernt liegen und auf Grund der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren die Transkription des entsprechenden Genes beeinflussen, werden von Myc gebunden, wenn auch schwächer als Kernpromotoren (Nie et al, 2012). Im untersuchten Myc-ChIP-Seq in HeLa-Zellen konnte ebenfalls eine *enhancer*-Assoziation beobachtet werden (Abb. 4.6). Im Gegensatz dazu

konnte keine Bindung von Miz1 in diesen Bereichen nachgewiesen werden. Dies führt zu der Annahme, dass Miz1 als Transkriptionsfaktor nur an Kernpromotoren wirkt. Des Weiteren zeigt es, dass der Miz1-ChIP-Seq valide ist, da die genomweite Miz1-Bindung nicht nur eine Folge der Myc-Bindung darstellt. Während die Interaktion von Myc mit *enhancern* in mehreren Zelltypen nachgewiesen werden konnte, sind die Auswirkungen auf die Genexpression Zelltyp-abhängig: so konnte in aktivierten B-Lymphozyten ein Einfluss auf die Regulation gezeigt werden (Nie et al, 2012), in Osteosarkomzellen nach Myc-Induktion allerdings nicht (Walz et al., 2014).

	Myc	Miz1
RNA-Polymerase I	✓	✗
RNA-Polymerase II	✓	✓
RNA-Polymerase III	✓	✓
<i>enhancer</i>	✓	✗

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Myc- und Miz1-Bindung der durch verschiedene RNA-Polymerasen transkribierten Gene.

5.1.3. Bildung eines heterotrimeren Myc/Max/Miz1-Komplexes

Die Bildung eines Myc/Miz1-Komplexes konnte mittels Immunpräzipitationen in HeLa-Zellen bereits validiert werden (Staller et al, 2001). Die Anzahl der bisher identifizierten Myc/Miz1-Zielgene ist allerdings begrenzt. Mit Hilfe der untersuchten ChIP-Seq-Datensätze konnten 2.879 gemeinsame Bindestellen in RNA-Polymerase II-transkribierten Genen identifiziert werden. Hierbei überlappen annähernd alle Miz1-Bindestellen mit einer Myc-Bindestelle, was darauf schließen lässt, dass Miz1 hauptsächlich in einem Komplex an der DNA mit Myc vorliegt. Daneben wurde noch eine Vielzahl von Myc-Bindestellen gefunden, die nicht mit einem Miz1-*peak* überlappen (Abb. 4.4 A). Diese Myc-Bindestellen sind zum Teil *enhancer*-Bereichen zuzuordnen (siehe Abschnitt 5.1.2). Allerdings ist anzumerken, dass dies auf die Sensitivität der Auswertungssoftware zurückzuführen sein könnte: wird kein *peak calling* durchgeführt, sondern direkt die Anzahl der *reads* in der Nähe von Transkriptionsstartstellen gezählt, erkennt man eine Anreicherung von Miz1 an annähernd allen Myc-gebundenen Promotoren (Abb. 4.5 B). Trotzdem konnten einige Gene identifiziert werden, wie beispielsweise *FBXW8*, die keine Miz1-Anreicherung im ChIP zeigen (Abb. 4.2 C). In reChIP-

Experimenten konnte die gleichzeitige Bindung von Myc und Miz1 an Zielgenen nachgewiesen werden (Abb. 4.4 C). Diese Resultate lassen darauf schließen, dass Myc und Miz1 in einer humanen Tumorzelllinie als Komplex an eine Vielzahl von Promotoren von bisher unbekanntem Zielgenen binden.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, bindet Myc an E-Boxen mit der Konsensussequenz CACGTG. Die DNA-Bindesequenz von Miz1 ist nicht bekannt, obwohl man weiß, dass es in einem Bereich um die TSS bindet, der als Initiator bezeichnet wird (Si et al, 2010; Peukert et al, 1997). Die Nähe der Miz1-Bindestellen zur TSS konnte mit Hilfe eines Histogramms veranschaulicht werden (Abb. 4.5 A), während die Myc-Bindestellen deutlich verteilter vorliegen. Mit Hilfe einer *de novo*-Motivsuche konnte ein Miz1-Bindemotiv in Promotoren, die stark Miz1-gebunden sind, identifiziert werden. Des Weiteren wurde in stark Myc-gebundenen Genen, wie erwartet, das E-Box-Konsensusmotiv gefunden (Abb. 4.11 A). Das Miz1-Motiv befindet sich zentral im *peak*, was ein Indiz für die Spezifität des Motivs ist (Abb. 4.11 B). Es besteht aus mehreren konservierten TC-, bzw. CT-Nukleotiden in einem Abstand von 3-7 weniger stark konservierten Nukleotiden. Es ist möglich, dass diese TC/CT-Nukleotide von einigen der 13 Zinkfinger von Miz1 erkannt werden und sich das Protein um die DNA-Helix windet, um über einen der anderen Zinkfinger mit einem weiteren TC/CT-Nukleotid zu interagieren. Um zu klären, welcher Zinkfinger auf welche Weise den DNA-Kontakt vermittelt, müsste Miz1 zusammen mit dem DNA-Bindemotiv kristallisiert und das Röntgenbeugemuster des Kristalls analysiert werden. Auf diese Weise würde man eine Miz1-Kristallstruktur mit gebundener DNA erhalten. Allerdings erfordert dieses Experiment die Aufreinigung von hochreinem Protein, was sich auf Grund der Zinkfinger bislang als schwierig erwies. So konnte bis jetzt lediglich die POZ-Domäne (Stead et al, 2007) sowie die Zinkfinger 5-10 (Bernard et al, 2013) ohne gebundene DNA aufgereinigt und kristallisiert werden.

Das Miz1-Motiv konnte ebenfalls mit Hilfe anderer ChIP-Seq-Datensätze aus einer weiteren humanen Tumorzelllinie (MDA-MD231) nachgewiesen werden. Zu beachten ist außerdem, dass ähnliche Motive auch unter Verwendung anderer Miz1-Antikörper (C-19, N-17, H-190) identifiziert wurden (Abb. 4.11 C). Außerdem weist das Miz1-Motiv eine starke Ähnlichkeit zu einer möglichen DNA-Bindesequenz auf, welche mit Hilfe der Aminosäuresequenz der Miz1-Zinkfinger ermittelt wurde. Die *in vitro*-Interaktion von Miz1 mit diesem *in silico* identifizierten Motiv wurde in einem EMSA-Experiment gezeigt (Abb. 4.12): rekombinantes, aufgereinigtes Miz1 Δ POZ-Protein bindet an das Miz1-Motiv, welches im Promotor mehrerer untersuchter Gene (*RSRC1*, *PLA2G15*, *ZNHIT3*, *TSHZ1*, *SNX18*) enthalten ist. Außerdem war diese Interaktion nicht nachzuweisen, wenn stark konservierte Nukleotide des Motivs mutiert

wurden (Abb. 4.13), wodurch die Spezifität der Interaktion von Miz1 mit dem DNA-Motiv bestätigt wurde. Des Weiteren konnte das Motiv auch mittels *de novo*-Motivsuche in einem Miz1-ChIP-Seq aus murinen primären Zellen (Wolf et al, 2013) gefunden werden, wodurch eine Konservierung zwischen Mensch und Maus nachgewiesen wird (Abb. 4.11 C). In der gleichen Publikation konnte die *in vitro*-Interaktion von in HeLa-Zellen exprimiertem Miz1-Protein mit dem Miz1-Motiv, welches in den Promotoren der Gene *AMBRA1* und *VPS28* vorkommt, gezeigt werden.

Zusätzlich konnte mit der *de novo*-Motivsuche ein Konsensus-E-Box-Motiv in stark Myc-gebundenen Bindestellen identifiziert werden (Abb. 4.11 A). Die spezifische Suche nach Nicht-Konsensus-E-Box-Motiven in den Myc-Bindestellen ergab zwar deren Vorhandensein, allerdings sind sie nicht statistisch signifikant angereichert (Daten nicht gezeigt). Dies konnte auch in einem Myc-ChIP-Seq in MCF10A-Brustepithelzellen gezeigt werden (Wiese et al., 2014, eingereicht). Betrachtet man nun die 1.000 stärksten Myc/Miz1-Bindestellen in HeLa-Zellen, stellt man fest, dass lediglich 24 % eine E-Box oder ein Miz1-Motiv enthalten (Abb. 4.10 B). Somit ist die DNA-Interaktion für einen Großteil der Bindestellen unabhängig von diesen beiden Motiven. Einen Hinweis auf die mögliche DNA-Bindung lieferte eine *de novo*-Motivsuche von Myc/Miz1-gebundenen Promotoren ohne Miz1-Motiv oder E-Box (Tab. 4.3): es wurden DNA-Interaktionsmotive von Transkriptionsfaktoren gefunden, für die zum Teil bereits Protein-Protein-Interaktionen mit Myc bekannt sind. Beispielsweise wurde ein Motiv mit Ähnlichkeit zum sekundären Bindemotiv des murinen Transkriptionsfaktors AP-2 ϵ identifiziert. Humanes AP-2 α interagiert mit Myc und inhibiert so die Myc-abhängige Transaktivierung von E-Box-haltigen Zielgenen wie *ODC1* (Gaubatz et al, 1995). Ein weiteres Motiv ist GC-reich und hat starke Ähnlichkeit mit dem DNA-Bindemotiv von Sp1, einem Transkriptionsfaktor, der ebenfalls an Myc bindet und zur Repression von *CDKN1A* und weiteren Zielgenen führt (Gartel et al, 2001). Außerdem wurde das DNA-Bindemotiv des trimeren NF-Y-Komplexes identifiziert. Die Untereinheiten des Komplexes, welche die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, interagieren auch mit Myc (Izumi et al, 2001; Taira et al, 1999). Ein weiteres Motiv entspricht einem ETS-Bindemotiv. Interaktionen von Myc mit einigen Proteinen, die ETS-Domänen enthalten (Elk3, Etv3) wurden bereits beschrieben (Agrawal et al, 2010; Alvarez et al, 1991). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Interaktion des Myc/Miz1-Komplexes mit Zielpromotoren nicht immer direkt erfolgen muss, sondern auch mit Hilfe weiterer Transkriptionsfaktoren, welche die DNA-Protein-Interaktion vermitteln, erfolgen kann. Dies könnte für die Gruppe der ribosomalen Proteingene relevant sein. Die Promotoren dieser Gene werden von Myc gebunden und transaktiviert (Wu et al, 2008; Boon et al, 2001; Kim et al, 2000). Außerdem konnte mit Hilfe bioinformatischer

Methoden gezeigt werden, dass diese Promotoren keine E-Boxen allerdings Bindesequenzen für Sp1, Gabp (enthält eine ETS-Bindedomäne) und Yy1 (Zinkfinger-Protein) enthalten (Perry, 2005). Des Weiteren sind diese Gene durch eine untypische Initiator-Sequenz charakterisiert (Meyuhas, 2000), die eine partielle Ähnlichkeit mit dem in dieser Arbeit identifizierten Miz1-Motiv zeigt. In weiterführenden Experimenten wäre es von Interesse, mit Hilfe von EMSAs und Reporterassays die Myc/Miz1-abhängige DNA-Bindung und die transkriptionelle Regulation dieser Gengruppe zu untersuchen.

Eine weitere Möglichkeit der DNA-Bindung des Myc/Miz1-Komplexes besteht in der Interaktion von Myc und Miz1 mit jeweils einem unvollständigen Miz1-Motiv und einer Nicht-Konsensus-E-Box. Auf diese Weise würden Myc und Miz1 kooperativ an DNA binden. Dies könnte beispielsweise der Fall für den *CDKN2B*-Promoter sein: er enthält ein schwach-konserviertes Miz1-Motiv sowie im Abstand von 100 bp eine Nicht-Konsensus-E-Box (Abb. 5.1). Allerdings ist die Myc-Bindung in diesem Bereich eher schwach ausgeprägt. Diese Möglichkeit der DNA-Bindung sollte bioinformatisch näher analysiert werden. Hierfür könnten Bindestellen mit Nicht-Konsensus-E-Boxen identifiziert werden und in einer räumlichen Nähe nach Miz1-Motiven gesucht werden. Anschließend sollte geprüft werden, ob an diesen Miz1-Motiven tatsächlich eine Miz1-Anreicherung gefunden werden kann um sicher zu stellen, dass auch die weniger stark konservierte Miz1-Motive gebunden werden. Im Anschluss kann mit Hilfe von EMSAs untersucht werden, ob die DNA-Bindung auf diese Weise zustande kommt und Reporterassays könnten zeigen, welchen Einfluss dies auf die Genexpression hat.

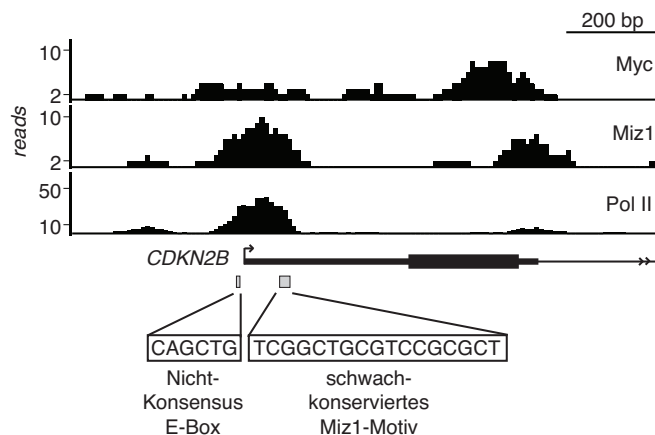


Abb. 5.1: Direkte DNA-Bindung von Myc und Miz1 an schwach-affine Bindestellen am Beispiel von *CDKN2B*.

Darstellung der Myc-, Miz1- und RNA-Polymerase II-Bindung an den Promoter des *CDKN2B*-Gens. Unterhalb des Gens ist die Lokalisation von Nicht-Konsensus-E-Box und Miz1-Motiv gezeigt.

Die in dieser Arbeit diskutierten DNA-Bindungsmöglichkeiten des Myc/Miz1-Komplexes sind in Abbildung 5.2 dargestellt. Der DNA-Kontakt wird entweder direkt über die Bindung eines der Proteine an das entsprechende Bindemotiv hergestellt, oder erfolgt indirekt mit Hilfe der Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie Sp1, AP-2, NF-Y oder der Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren. Des Weiteren könnte in schwach-affinen Myc/Miz1-Bindestellen die Interaktion über weniger stark konservierte Bindemotive erfolgen, wie anhand des *CDKN2B*-Promoters dargestellt ist.

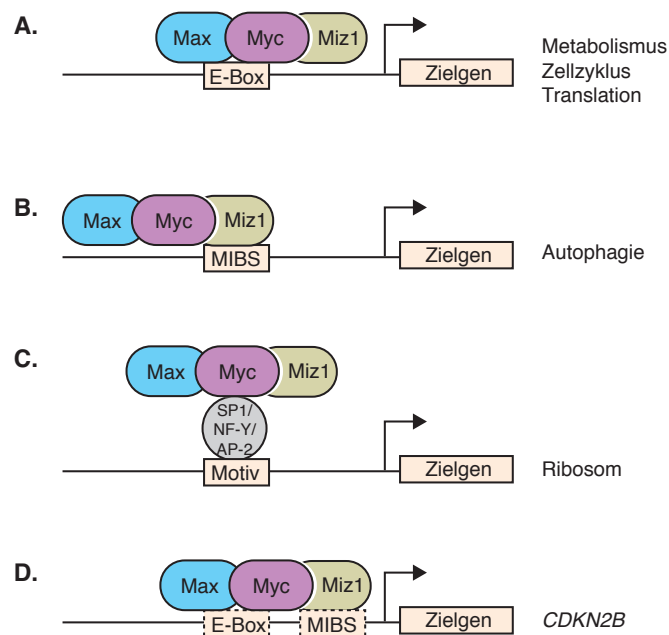


Abb. 5.2: DNA-Bindemodi des Myc/Miz1-Komplexes.

(A) Der direkte DNA-Kontakt wird durch Myc und seine Interaktion mit Konsensus-E-Boxen vermittelt. Miz1 wird in der Folge an diese Promotoren rekrutiert. Als Zielgene wurden mit Hilfe von funktionellen Genontologie-Analysen Gene identifiziert, die eine Rolle in Translation, Zellzyklus und Metabolismus spielen (Tab. 4.4).

(B) Gene, welche ein Miz1-Motiv enthalten, wie beispielsweise Autophagie-assoziierte Gene (Wolf et al., 2013), werden direkt von Miz1 gebunden. Der Myc/Max-Komplex ist nur indirekt über die Myc/Miz1-Interaktion gebunden. MIBS: Miz1-Bindesequenz

(C) Der Myc/Miz1/Max-Komplex bindet nur indirekt an Zielgene, wie Gene kodierend für ribosomale Proteine. Der DNA-Kontakt wird über weitere Transkriptionsfaktoren vermittelt, die an spezifische DNA-Sequenzen („Motiv“) im Promoter binden.

(D) Wie anhand des *CDKN2B*-Promoters gezeigt ist, könnte die Bindung des Myc/Miz1-Komplexes direkt über eine Nicht-Konsensus-E-Box sowie ein schwach-konserviertes Miz1-Motiv erfolgen. MIBS: Miz1-Bindesequenz.

Da in einem Promoter eine E-Box oder ein Miz1-Motiv exklusiv vorhanden ist, legt dies den Schluss nahe, dass der DNA-Kontakt entsprechend entweder von Myc oder von Miz1 hergestellt wird. Das jeweils andere Protein wird ohne direkte DNA-Interaktion an diese

Promotoren rekrutiert. In ChIP-Experimenten nach Myc-Depletion konnte eine stark verminderte Bindung von Miz1 an E-Box-enhaltende Zielgene, nicht aber an Miz1-Motiv-enhaltende Promotoren beobachtet werden (Abb. 4.16). Folglich wird Miz1 von Myc an E-Box-Promotoren rekrutiert. Daraus resultiert eine schwächere *crosslinking*-Effektivität in ChIP- und ChIP-Seq-Experimenten für Miz1 an E-Box-Promotoren, da der direkte Miz1-DNA-Kontakt nicht zustande kommt. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass Bindestellen in E-Box-haltigen Promotoren viel Myc, aber deutlich weniger Miz1 enthalten (Abb. 4.10 B). Weitere Gründe für dieses unterschiedliche Bindungsverhalten werden im Abschnitt 5.2 diskutiert. Das ChIP-Experiment nach Miz1-Depletion war nicht erfolgreich, weil infolgedessen Myc ebenfalls depletiert wird. Dies liegt an der Stabilisierung von Myc durch Miz1 (Salghetti et al, 1999).

Gestützt wird das Modell der gegenseitigen Rekrutierung von Experimenten in U2OS-Osteosarkomzellen, welche ein Doxyzyklin-induzierbares *MYC*-Allel tragen. Hier wird Miz1 nach Induktion von Myc an E-Box-Promotoren wie *PPRC1* rekrutiert, während Gene mit Miz1-Motiv (*VPS72*) keine verstärkte Anreicherung von Miz1 zeigen (Walz et al., 2014).

Die Rekrutierung von Miz1 konnte auch in T-Lymphozyten aus murinen Lymphomen validiert werden, in welchen Myc Doxyzyklin-abhängig reprimiert werden kann (Walz et al., 2014). Hierbei ist eine starke Abnahme von Myc an Myc/Miz1-Zielgenen nach Myc-Inaktivierung zu beobachten. Gleichzeitig nimmt die Bindung von Miz1 deutlich an diesen Promotoren ab. Dies veranschaulicht, dass Miz1 nicht nur zu der vergleichsweise kleinen Gruppe der Miz1-Bindemotiv-enhaltenden Promotoren rekrutiert wird, sondern dass dieses Verhalten genomweit zu beobachten ist. Somit konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung von Miz1 an Myc/Miz1-Zielgene nicht nur in humanen HeLa-Zellen sondern auch in anderen Tumorzellen stattfindet.

5.2. Regulation von Myc/Miz1-Zielgenen

Im ersten Teil dieser Diskussion wurde beschrieben, an welche Gene und Gengruppen der Myc/Miz1-Komplex bindet und welche Möglichkeiten des DNA-Kontakts bestehen. Daraus resultiert die Frage, ob die unterschiedlichen Möglichkeiten des DNA-Kontaktes des Myc/Miz1-Komplexes zu einer verschiedenen transkriptionellen Regulation in Tumorzellen führen. Die Regulation von Myc/Miz1-Zielgenen konnte bisher nur an einzelnen Beispielen gezeigt werden. So wird die Transkription von Zellzyklusinhibitoren wie *CDKN1A* und *CDKN2B* mittels eines trimeren Myc/Max/Miz1-Komplexes, welcher die Rekrutierung von

aktivierenden Kofaktoren, wie p300 verhindert, reprimiert (Staller et al, 2001). Um die genomweite transkriptionelle Regulation zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit Lentiviren, die shRNAs gegen Myc und Miz1 exprimieren, infiziert und anschließend ein Microarray durchgeführt. Eine anschließende bioinformatische Auswertung der nach Myc-Depletion regulierten Gene durch GSEA-Analysen zeigte eine Anreicherung von Gensets, welche bekannte Myc-aktivierte Gene enthalten. Auch konnten statistisch signifikant angereicherte Gensets Myc-reprimierter Gene identifiziert werden, die im Microarray-Experiment ebenfalls reprimiert waren (Tab. 4.5 und 4.6). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Myc/Miz1-gebundene Gene mit einer Konsensus-E-Box von Myc aktiviert werden. Im Gegensatz dazu werden Myc/Miz1-Zielgene, welche ein Miz1-Motiv enthalten, von Miz1 aktiviert (Abb. 4.20 B). Diese Gene sind nach Myc-Depletion nicht reguliert (Abb. 4.19), d. h. die Miz1-vermittelte transkriptionelle Aktivierung dieser Gengruppe stellt eine Myc-unabhängige Funktion dar (Abb. 5.3). Dies konnte auch in einer Studie zur Miz1-Funktion im Kleinhirn von Mäusen gezeigt werden (Wolf et al, 2013). Miz1 Δ POZ-Mäuse zeigten einen Verlust von Purkinje-Zellen im Cerebellum, wodurch es mit zunehmendem Alter zu neurodegenerativen Erscheinungen wie Tremor und Störungen des Bewegungsablaufs kommt. Der Verlust von Purkinje-Zellen ist die Folge von verminderter Autophagie, ersichtlich an der altersabhängigen Akkumulation von ubiquitinierten Proteinen. Interessanterweise enthalten viele Autophagie-assoziierte Gene ein Miz1-Motiv im Promoter und sind stark von Miz1 gebunden. Eine RNA-Seq-Analyse von Miz1 Δ POZ-Kleinhirnen zeigte, dass diese Gene nach Verlust der Miz1-Funktion nicht mehr transkriptionell aktiviert werden können. 99 der 132 Bindestellen in Promotoren (75 %; p-Wert < 2,2E-308), welche in neuronalen Zellen von Miz1 gebunden sind, sind ebenfalls in HeLa-Zellen Miz1-Zielgene. Im Gegensatz zu primären neuronalen Zellen enthalten HeLa-Zellen große Mengen an Myc-Protein. Ein großer Anteil von Myc liegt im Komplex mit Miz1 vor, wodurch es zu einer starken Zunahme von Miz1-Bindestellen in Tumorzellen im Vergleich zu primären Zellen kommt (Abb. 4.15).

Die Myc/Miz1-abhängige Repression konnte mit GSEA-Analysen gezeigt werden: Gensets Myc-reprimierter Gene sind für Gene angereichert, die nach Depletion von Myc hochreguliert sind (Tab. 4.6 links). Ein Teil dieser Gene wird durch Miz1 aktiviert, da Gensets Myc-reprimierter Gene nach Miz1-Depletion angereichert sind für reprimierte Gene (Tab. 4.6 rechts). Dies bedeutet, dass es eine Gengruppe gibt, die von Miz1 aktiviert und von Myc reprimiert wird. Die in der GSEA-Analyse signifikanten Gensets Myc-reprimierter Gene enthalten unter anderem bekannte Myc/Miz-reprimierte Zielgene wie *CDKN1A*, *CDKN2B*, *CEBPA* und Zelladhäsionsgene wie Integrine. Allerdings ist bei dieser Analyse anzumerken, dass die Analyse der Miz1-Depletion keinen signifikanten q-Wert lieferte. Dies liegt zum einen daran, dass die Genexpressionsänderungen nach Miz1-Depletion generell sehr

schwach waren. Zum anderen ist eine vollständige Miz1-Depletion nur schwer zu erreichen. Im vorliegenden Experiment konnten lediglich 75 % des Proteins depletiert werden, die verbleibenden 25 % scheinen ausreichend zu sein für die Aufrechterhaltung der Miz1-Funktion in HeLa-Zellen. So zeigen heterozygote Miz1 Δ POZ-Mäuse, analysiert in verschiedenen biologischen Systemen, keinen Unterschied zu Miz1-Wildtyp-Mäusen (Adhikary et al, 2003; Gebhardt et al, 2007; Wolf et al, 2013). Die essentielle Funktion von Miz1 wird überdies deutlich, wenn man die Versuche betrachtet, komplette Miz1-*knockout*-Mäuse zu generieren. Miz1^{-/-}-Mäuse sterben frühzeitig in der embryonalen Entwicklung an Tag E7,5, da die Gastrulation ausbleibt (Adhikary et al, 2003). Außerdem sind konditionale Miz1-*knockouts* nur möglich, wenn lediglich die POZ-Domäne deletiert wird (Wolf et al, 2013; Gebhardt et al, 2007). Bisher konnte kein vollständiger, konditionaler Miz1-*knockout* erzeugt werden.

Die Myc/Miz1-abhängige transkriptionelle Repression wird gestützt durch Experimente in U2OS-Zellen, welche ein induzierbares Myc- oder MycV394D-Allel enthalten. MycV394D ist ein Punktmutante, die zwar an Max, nicht aber an Miz1 binden kann (Herold et al, 2002) und somit die Miz1-abhängige Repression, nicht aber die Myc-Aktivierung, unterbindet (van Riggelen et al, 2010; Gebhardt et al, 2006). Wird Myc bzw. MycV394D in U2OS-Zellen induziert, so ist die genomweit gemessene Genaktivierung kaum durch MycV394D beeinflusst, die Fähigkeit zur Repression hingegen ist signifikant reduziert (Walz et al., 2014). Im gleichen Experiment wurde mit Hilfe einer shRNA gegen Miz1 gezeigt, dass die verminderte Repression nach MycV394D-Induktion abhängig von Miz1 ist. Mit Hilfe der MycV394D-Mutante konnte auch in humanen Brustepithelzellen eine verminderte Repression nach MycV394D-Aktivierung im Vergleich zu Myc nachgewiesen werden (Wiese et al., 2014, eingereicht). Die Aktivierung der Genexpression ist nach Induktion von Myc oder MycV394D annähernd identisch. Ähnliches konnte auch in RNA-Seq-Experimenten muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs), in denen die Tamoxifen-abhängige Expression der Cre-Rekombinase zu einer Deletion der POZ-Domäne führt (Miz1 ^{Δ POZ/ Δ POZ}), gezeigt werden (Walz et al., 2014). Die Induktion von Myc bzw. MycV394D führte zu einer Aktivierung von Genen, sowohl in Miz1-Wildtyp als auch Miz1 ^{Δ POZ/ Δ POZ}-MEFs. Miz1-aktivierte Gene waren im Gegensatz dazu nicht abhängig von der Expression von Myc oder MycV394D. Gene hingegen, die durch Myc-reprimiert werden, zeigten eine starke Derepression in Miz1 ^{Δ POZ/ Δ POZ}-MEFs und waren im gleichen Maße schwächer reprimiert nach MycV394D-Induktion (Walz et al., 2014). Auf diese Weise konnte die Abhängigkeit der Myc-vermittelten Repression von Miz1 in mehreren, sowohl humanen als auch murinen Modellen nachgewiesen werden. Besonders herauszuheben ist hierbei das Fibroblasten-Modell, da es sich hierbei um eine Deletion von Miz1 auf genomischer Ebene handelt und nicht durch eine

shRNA-vermittelte Depletion, wodurch immer eine Restaktivität von Miz1 erhalten bleiben kann.

In Anbetracht der Erkenntnisse, die bezüglich der DNA-Bindung des Myc/Miz1-Komplexes gewonnen werden konnten, stellte sich die Frage, ob die beobachteten Unterschiede in den Bindestärken beider Proteine einen Rückschluss auf die Richtung der Regulation geben können. Wie bereits diskutiert, enthalten Promotoren Myc-aktivierter Gene viel Myc und wenig Miz1, während Promotoren Miz1-aktivierter Gene viel Miz1 aber wenig Myc aufweisen. Die Berechnung eines Verhältnisses von Myc zur Miz1-Bindestärke und der anschließende Vergleich mit den Expressionsdaten nach Myc-Depletion belegte eine Korrelation von Genexpression mit dem Myc/Miz1-Verhältnis am Promoter (Abb. 4.21). Myc-aktivierte Gene zeigen, wie aus vorangegangenen Analysen bereits ersichtlich war, eine starke Myc-Bindung (Myc/Miz1-Verhältnis $> 1,5$). Miz1-aktivierte Gene wurden mit Hilfe eines RNA-Seq-Datensatzes aus neuronalen Zellen muriner Kleinhirne nach Miz1 Δ POZ-Deletion gewonnen (Wolf et al, 2013). Diese Miz1-aktivierten Gene zeigen eine starke Miz1-Besetzung und haben deshalb ein kleines Myc/Miz1-Verhältnis ($< 0,5$). Die zugehörigen Bindestellen enthalten, wie zuvor bereits diskutiert, mehrheitlich das Miz1-DNA-Bindemotiv. Interessanterweise sind Gene, welche Bindestellen mit einem Myc/Miz1-Verhältnis um 1 haben, mehrheitlich durch Myc reprimiert. Somit ergibt sich ein Modell, in dem die Richtung der transkriptionellen Regulation direkt mit dem Verhältnis von Myc und Miz1 in Promoter-gebundenen Komplexen, korreliert (Abb. 5.3). An Miz1-aktivierten Promotoren ist hauptsächlich Miz1 alleine gebunden und nur in wenigen Zellen kommen Myc/Max/Miz1-Komplexe vor. Dies führt zu einem starken Miz1-Signal an diesen Promotoren und einem schwachen Myc-Signal. Die transkriptionelle Regulation wird durch die Vielzahl von Miz1-gebundenen Promotoren bestimmt und führt zu einer Aktivierung. Andererseits enthalten Myc-aktivierte Promotoren zum Großteil Myc/Max-Komplexe und nur wenige Myc/Max/Miz1-Komplexe. Folglich ergibt sich eine hohe Myc-Bindestärke und eine niedrige Miz1-Bindung, das Verhältnis verschiebt sich also in Richtung Myc. Im Gegensatz dazu beinhalten Promotoren Myc-reprimierter Gene in erster Linie Myc/Max/Miz1-Komplexe, die zu einer Genrepression führen. Hierbei kann die DNA-Bindung der Myc/Max/Miz1-Komplexe indirekt, wie oben bereits diskutiert, durch Protein-Protein-Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren wie Sp1 oder die Bindung an schwach-konservierte Bindemotive und Nicht-Konsensus-E-Boxen erfolgen. Die Korrelation des Myc/Miz1-Verhältnisses mit den Auswirkungen auf die Genregulation konnte ebenfalls im bereits beschriebenen T-Lymphozyten-Modell aus murinen Lymphomen beobachtet werden (Walz et al., 2014; Muller et al, 2010). Auch hier enthalten Promotoren Myc-aktivierter Gene deutlich höhere Myc-Mengen, d. h. die Bindung

des Myc/Max-Komplexes dominiert an diesen Genen. Überwiegt allerdings der Myc/Max/Miz1-Komplex hat das eine Genrepression zur Folge.

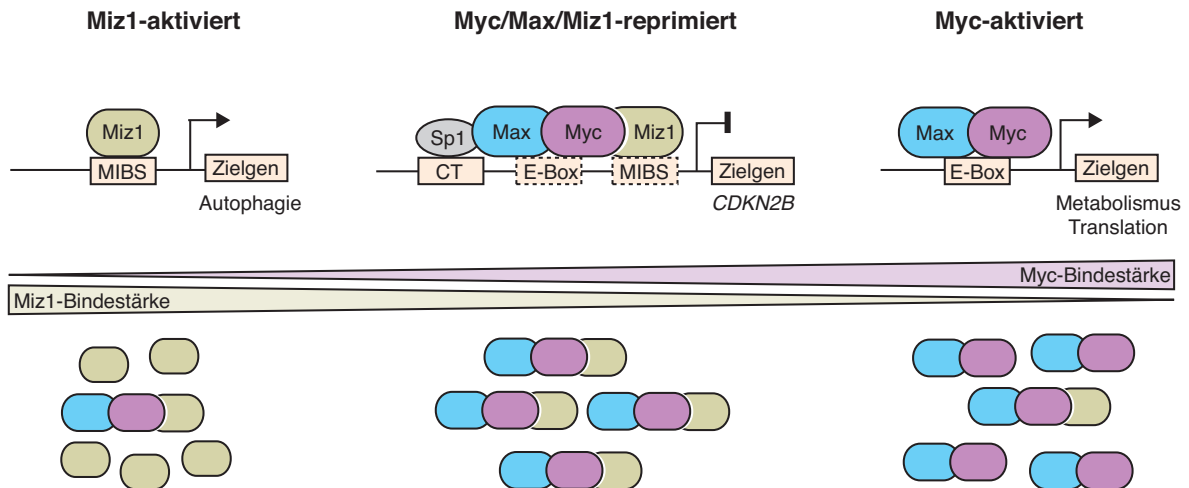


Abb. 5.3: Modell der Myc/Miz1-vermittelten Genregulation.

Promotoren, welche mehrheitlich von Miz1 gebunden sind, werden transkriptionell durch Miz1 aktiviert, während Myc/Max-gebundene Promotoren durch Myc aktiviert werden. Eine Repression von Genen tritt dagegen auf, wenn Myc/Max/Miz1-Komplexe vorrangig vorhanden sind, wie hier am Beispiel von *CDKN2B* dargestellt. MIBS: Miz1-Bindemotiv, CT: CT-Element (Sp1-Bindemotiv).

Nachdem untersucht wurde, welche Auswirkungen die Bindung des Myc/Max/Miz1-Komplexes auf die transkriptionelle Regulation von Zielgenen hat, stellt sich die Frage nach dem Mechanismus der Regulation. Hierfür lieferten Ergebnisse aus U2OS-Zellen von Francesca Lorenzin eine mögliche Erklärung (Walz et al., 2014). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Myc-abhängige transkriptionelle Aktivierung auf Grund einer Myc-vermittelten Steigerung der Elongationsrate der RNA-Polymerase II erreicht wird (Lin et al, 2012). Aufgrund dessen wurden ChIP-Seq-Datensätze für Myc, Gesamt-RNA-Polymerase II, Serin 5-phosphorylierte (Ser5) CTD der RNA-Polymerase II und Serin 2-phosphorylierte (Ser2) CTD der RNA-Polymerase II vor und nach Myc-Induktion in Osteosarkomzellen analysiert. Genomweit konnte eine Rekrutierung von Myc sowohl an aktivierte als auch reprimierte Gene beobachtet werden. An aktivierten Genen nimmt die Gesamt-RNA-Polymerase II als auch die RNA-Polymerase II mit Ser5-phosphorylierter CTD entsprechend der Myc-Rekrutierung dieser Gene zu. Dies bedeutet, dass die transkriptionelle Aktivierung durch eine gesteigerte Initiationsrate erreicht wird. An reprimierten Genen ist nach Myc-Induktion weniger Gesamt-RNA-Polymerase II an der TSS gebunden. Die Phosphorylierung an Ser5 der CTD wird ebenfalls verringert, woraus man schließen kann, dass die Repression

auf einer geringeren Initiationsrate beruht (Walz et al., 2014). Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass Myc mit TFII-I, einem Bestandteil der Transkriptionsmaschinerie, interagiert und somit zur Repression führt (Roy et al, 1993). Um zu untersuchen, ob Myc auch, wie bereits publiziert, einen Einfluss auf die Elongationsrate der RNA-Polymerase II hat, wurde die Serin 2-Phosphorylierung der CTD am Transkriptionsende analysiert. Es zeigte sich, dass an aktivierten Genen deutlich mehr Ser2-phosphorylierte RNA-Polymerase II gebunden ist, als initiierte RNA-Polymerase II an der TSS. Somit erhöht Myc nicht nur die Elongationsrate sondern auch die Initiation der RNA-Polymerase an transkriptionell aktivierten Genen. An reprimierten Genen nimmt die Besetzung mit an Ser2-phosphorylierter CTD der RNA-Polymerase II ab und ist geringer als die Besetzung mit Gesamt-RNA-Polymerase II an der TSS. Die schwächere Initiation am Transkriptionsstart hebt den positiven Effekt von Myc auf die Elongation der RNA-Polymerase II auf und führt in der Summe zur Repression von Zielgenen.

Wie wird nun diese unterschiedliche transkriptionelle Regulation mechanistisch durch die RNA-Polymerase II realisiert? Es ist bekannt, dass die Struktur der DNA einen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von Genen hat (Baranello et al, 2012; Kouzine & Levens, 2007). So wird im Promoterbereich aktiv transkribierter Gene *supercoiled* DNA gefunden (Kouzine et al, 2008; Kouzine et al, 2004). Bewegt sich die RNA-Polymerase II entlang eines DNA-Stranges, muss dieser lokal geöffnet werden. Dadurch entsteht im Bereich vor der Polymerase ein positiver *supercoil*, im Bereich dahinter ein negativer *supercoil* (Liu & Wang, 1978). Zum Auflösen der *supercoil*-DNA-Struktur sind Topoisomerasen nötig, die lokal einen DNA-Strang aufschneiden und nach der Auflösung eines *supercoils* den DNA-Strang wieder ligieren (Roca, 2011). Das Entstehen von negativen *supercoiled* DNA-Bereichen im Bereich von Promotoren transkribierter Gene konnte in humanen B-Lymphozyten aus Burkitt-Lymphomen gezeigt werden, wobei mehrere hundert Gene untersucht wurden (Kouzine et al, 2013). Für die Bildung des Prä-Initiationskomplexes und die Initiation der Transkription ist das Krümmen und Schmelzen der DNA-Stränge nötig, was durch die Ausbildung eines negativen *supercoils* ermöglicht wird (Revyakin et al, 2004; Parvin & Sharp, 1993). Dieser macht den Promoter somit für die Transkriptionsmaschinerie sowie Transkriptionsfaktoren leichter zugänglich. Für den Promoter des *MYC*-Gens konnte gezeigt werden, dass die Sp1-Bindestelle (CT-Element) eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Regulation mit Hilfe von *supercoiled*-DNA-Bereichen spielt. Liegt die DNA in B-Form vor, also einer rechtsgängigen Doppelhelix, bindet Sp1 an das CT-Element und aktiviert die Transkription. Dadurch entsteht ein negativer *supercoil* und die DNA-Stränge werden aufgeschmolzen. Daraufhin können die Einzelstrang-Bindeproteine Hnrnpk und Cnbp an das CT-Element binden und den Promoter auf diese Weise in einem aktiven Zustand halten. Binden diese

Transkriptionsfaktoren nicht an das CT-Element bildet sich lokal eine G-Quadruplexstruktur des DNA-Strangs aus und die Transkription wird inhibiert (Brooks & Hurley, 2009; Tomonaga & Levens, 1996; Michelotti et al, 1995). In den in dieser Arbeit identifizierten Myc/Miz1-Bindestellen findet man eine Anreicherung von Promotoren mit Sp1-Motiv (Tab. 4.3). Betrachtet man nur Myc-reprimierte Gene, ist das einzige signifikant vorkommende Motiv ebenfalls eine Sp1-Bindestelle (Walz et al., 2014). Da Myc mit Sp1 (Gartel et al, 2001) als auch mit Hnrnpk interagiert (Koch et al, 2007), wäre es denkbar, dass die transkriptionelle Aktivierung von Myc-Zielgenen durch die Myc-abhängige Rekrutierung von Hnrnpk erfolgt. Das für die Repression nötige Signal könnte durch die vermehrte Rekrutierung von Myc/Miz1-Komplexen erreicht werden.

5.2.1. Modell der generellen Genaktivierung durch Myc

Vor kurzem wurde ein weiterer Mechanismus der transkriptionellen Aktivierung durch Myc beschrieben (Nie et al, 2012). Hierbei wird ein globaler ausschließlich transaktivierender Einfluss von Myc in primären murinen B- und T-Lymphozyten nach deren Aktivierung, gezeigt. Nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS), bzw. Concanavalin A zeigen diese Zellen ein massives Zellwachstum, eine Zunahme an Gesamt- und mRNA sowie eine starke Induktion von Myc. Die Autoren zeigen, dass die Myc-Bindung von RNA-Polymerase II-Genen nach Induktion mit ihrer transkriptionellen Aktivierung und der Bindung von RNA-Polymerase II korreliert. Des Weiteren wurde beobachtet, dass nach Myc-Induktion die Elongationsrate der RNA-Polymerase II erhöht wird, indem am Promoter pausierende RNA-Polymerase II gelöst wird. Der Einfluss von Myc auf die pausierende RNA-Polymerase II konnte genomweit in embryonalen Stammzellen gezeigt werden (Rahl et al, 2010). Myc rekrutiert P-Tefb um eine Phosphorylierung der CTD an Ser2 der RNA-Polymerase II zu stimulieren und die Elongation zu initiieren. Auch in Myc-überexprimierenden P493-B-Lymphozyten aus Burkitt-Lymphomen konnte eine Korrelation von Myc-Induktion mit der Zunahme von Ser2-phosphorylierter RNA-Polymerase II, einer daraus folgenden gesteigerten Elongationsrate der RNA-Polymerase II und einem globalen Anstieg der Genexpression beobachtet werden (Lin et al, 2012). Durch die publizierten Daten von Nie und Lin entsteht der Eindruck einer transkriptionellen Repression nur aufgrund des Normalisierungsverfahrens auf die Gesamt-RNA-Menge. Würden die Daten allerdings, wie vorgeschlagen auf die Zellzahl normalisiert, würde man erkennen, dass diese Gene eigentlich aktiviert werden, allerdings schwächer als der Durchschnitt aller Gene. Des Weiteren wird die bisher beobachtete Myc-abhängige Repression durch indirekte Effekte

erklärt: bei einer linearen Genamplifikation durch Myc werden zusätzlich transkriptionelle Repressoren oder Chromatin-modifizierende Repressoren transkriptionell aktiviert, welche dann an Myc-Zielgene rekrutiert werden und diese reprimieren. So aktiviert Myc nach B-Lymphozyten-Stimulation beispielsweise Ezh2, das die Methylierung des Lysin 27-Rests des Histons H3 katalysiert. Dadurch kommt es zu einer genomweiten transkriptionellen Repression (Nie et al, 2012).

In der vorliegenden Arbeit sollte neben der deskriptiven Analyse der Myc- und Miz1-Bindestellen auch der genomweite Einfluss von Myc auf die Genexpression und somit die Korrektheit des Modells der generellen Genamplifikation durch Myc untersucht werden. Im Gegensatz zu aktivierten B-Lymphozyten (siehe Abschnitt 1.3.2) zeigen HeLa-Zellen nach Myc-Depletion kaum eine Änderung der Zellgröße sowie der RNA-Menge (Abb. 4.17). Betrachtet man die Genexpression in B-Lymphozyten nach LPS-Aktivierung von Myc/Miz1-gebundenen Genen, die entweder eine E-Box oder das Miz1-Motiv enthalten, ist zu erkennen, dass E-Box-enthaltende Gene transkriptionell aktiviert werden, während Miz1-Motiv-enthaltende Gene nicht auf eine Myc-Induktion reagieren (Abb. 4.14 A). Hervorzuheben ist, dass die parallel untersuchte Myc-Rekrutierung in beiden Gruppen in ähnlichem Maße vorhanden war (Abb. 4.14 B). Die beobachtete transkriptionelle Repression Miz1-Motiv-enthaltender Gene ist folglich ein direkter Effekt. Somit konnte mit Hilfe der Daten von Nie und Kollegen nachgewiesen werden, dass es durchaus Gengruppen gibt, die eine Rekrutierung von Myc an Promotoren zeigen, aber nicht aktiviert werden. Folglich kann das Modell der generellen Genamplifikation durch Myc kein globaler Mechanismus in Zellen mit hohen Myc-Proteinmengen sein. Ungeachtet dessen scheinen Zellen, die wie stimulierte B-Lymphozyten, ein starkes Größenwachstum aufweisen, einen Großteil der Gene, welche für einen gesteigerten Metabolismus und eine Erhöhung der Translation (z. B. RNA-Prozessierung und Ribosomenbiogenese) nötig sind, zu aktivieren. Das durch Myc induzierte Größenwachstum von B-Lymphozyten konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden (Nie et al, 2012; Schuhmacher et al, 1999; Iritani & Eisenman, 1999). Die Myc-abhängige Induktion von Zellwachstum wird auch in anderen zellulären Systemen *in vivo* beobachtet: so führt eine Myc-Überexpression in der murinen Leber zu einer Induktion von ribosomalen Genen und zu einer Hypertrophie von Hepatozyten (Baena et al, 2005; Kim et al, 2000). Eine globale Aktivierung der Genexpression konnte hierbei nicht beobachtet werden. Außerdem führt eine Doxyzyklin-abhängige Myc-Induktion in murinen Kardiomyozyten zur Zunahme ihrer Zellmasse (Lee et al, 2009). Unter anabolem Größenwachstum von Skelettmuskelzellen ist ebenfalls eine Zunahme von Myc-mRNA als auch Myc-Protein zu beobachten, sowie eine Induktion von ribosomalen Proteinen und Proteinen, die für die Ribosomenbiogenese nötig sind (Chaillou et al, 2013; von Walden et al, 2012; Whitelaw & Hesketh, 1992). Globale

Änderungen der Genexpression wurden in diesen Studien nicht untersucht. Mit Hilfe von Microarray- oder RNA-Seq-Experiment könnte in diesen Systemen analysiert werden, ob Myc global zur Genaktivierung beiträgt und so zur Hypertrophie der jeweiligen Zellen führt.

Es gibt mehrere Gesichtspunkte, die es unwahrscheinlich erscheinen lassen, dass Myc zu einer globalen Genaktivierung beiträgt. Zum einen ist eine koordinierte Genrepression auf Ebene der Transkription nötig. So müssen beispielsweise Zyklin-abhängige Kinasen (CDKs) sowie ihre Inhibitoren (CDKNs) bei hohen Myc-Proteinmengen unterschiedlich exprimiert werden. Hohe Myc-Proteinmengen induzieren einen Anstieg der Proliferation, der nur erreicht werden kann, wenn CDKs stärker exprimiert werden als CDKNs (Hermeking et al, 2000). Bei einer gleichmäßigen Zunahme der Genexpression von CDKs und CDKNs nach Myc-Induktion könnte es nicht zu einer Erhöhung der Proliferation kommen.

Zum anderen gibt schon die Existenz von E-Boxen einen Hinweis auf die unterschiedliche Expression von Genen. E-Box-haltige Promotoren stellen hoch-affine Myc-Bindestellen auch bei niedrigen Myc-Proteinmengen dar und zeigen somit eine deutlich stärkere Bindung von Myc als nicht-E-Box-haltige Promotoren (Walz et al., 2014; Wiese et al., 2014, eingereicht; Perna et al, 2012; Lin et al, 2012). Außerdem sind E-Boxen und Regionen, welche E-Boxen flankieren evolutionär konserviert (Haggerty et al, 2003). Das wiederum lässt vermuten, dass es einen evolutionären Druck gibt, eine Gruppe von Myc-Zielgenen stärker zu binden und unterschiedlich zu exprimieren als andere (Walz et al., 2014). Dies legt den Schluss nahe, dass entgegen dem Modell der generellen Genamplifikation durch Myc, nicht alle Gene bei einer Zunahme der Myc-Proteinmenge in gleichem Maße amplifiziert werden. Zudem konnte in Myc-ChIP-Seq-Studien verschiedener Zelllinien gezeigt werden, dass Myc zwar einige Gruppen von Genen, beispielsweise beteiligt an der Ribosomenbiogenese, RNA-Prozessierung und Translation, zelltypübergreifend bindet, andere Gene aber zelltypspezifisch gebunden werden (Lee et al, 2012). Betrachtet man die Myc-Bindung in verschiedenen murinen Tumormodellen sieht man auch hier, dass gemeinsame Bindestellen den oben erwähnten Gengruppen entsprechen (Walz et al., 2014). Myc-Zielgene, die funktionellen Prozessen wie Zelladhäsion, Angiogenese oder Apoptose zugeordnet werden können, sind hingegen zelltypspezifisch gebunden. Auch diese Zielgenspezifität in unterschiedlichen zellulären Systemen ist ein Indiz dafür, dass das Modell der generellen Myc-abhängigen Genamplifikation nicht grundsätzlich zutrifft.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass Modell der generellen Genamplifikation durch Myc in den meisten zellulären Systemen nicht den Tatsachen entspricht. Stattdessen kann eine direkte transkriptionelle Genrepression Myc-gebundener Gene in Zellen mit hohen Myc-Proteinmengen beobachtet werden (Walz et al, 2014; Wiese et al., 2014, eingereicht). Des

Weiteren konnte in mehreren Studien eine Zielgen-Spezifität von Myc beobachtet werden, welche darauf schließen lässt, dass einige Gruppen von Myc-Zielgenen stärker gebunden sind als andere und folglich unterschiedlich stark exprimiert werden. Trotzdem scheint es in Zellen, die ein starkes Größenwachstum zeigen (z. B. aktivierte B-Lymphozyten (Nie et al, 2012)), eine lineare Myc-abhängige Genamplifikation zu geben. Dies könnte zutreffen, wenn die basalen Myc-Proteinmengen gering sind und es nicht zu einer Komplexbildung mit Miz1 kommt.

6. Zusammenfassung

6.1. Deutsche Zusammenfassung

Die Deregulation des Transkriptionsfaktors Myc ist ein charakteristisches Merkmal für eine Vielzahl von humanen Tumoren. Durch die transkriptionelle Aktivierung von Genen, die im Zusammenhang mit Metabolismus, Translation und Proliferation stehen, wird dadurch das Tumorwachstum begünstigt. Myc bildet zudem mit dem Zinkfinger-Protein Miz1 einen Komplex, der hemmend auf die Transkription von Zielgenen wirkt. Bisher sind nur wenige Myc/Miz1-reprimierte Zielgene bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnten genomweit die DNA-Bindestellen von Myc und Miz1 durch Chromatin-Immunpräzipitationen gefolgt von Hochdurchsatzsequenzierung in einer Zervixkarzinomzelllinie bestimmt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Myc an Promotoren aller drei RNA-Polymerasen sowie in *enhancer*-Regionen bindet, während Miz1 Kernpromotoren von RNA-Polymerase II- und III-transkribierten Genen besetzt. reChIP-Experimente zeigten, dass Myc und Miz1 als Komplex an Promotoren von Zielgenen binden. Zudem wurde ein Miz1-DNA-Bindemotiv identifiziert und der transaktivierende Einfluss von Miz1 auf Gene mit diesem Motiv nachgewiesen. Das überwiegende Vorhandensein von Myc/Max-Komplexen führt zu einer Transaktivierung von E-Box-haltigen Promotoren. Andererseits erfolgt die transkriptionelle Repression von Myc/Miz1-Zielgenen an Promotoren, an denen der Myc/Miz1-Komplex vorherrscht.

In aktuellen Publikationen konnte gezeigt werden, dass nach mitogener Stimulation von Lymphozyten es zu einer Erhöhung der Myc-Expression kommt, wodurch Myc als ein genereller Transkriptionsaktivator fungiert, der alle Gene gleichermaßen induziert. Trotz hoher Myc-Mengen in Tumorzellen konnte die generelle Myc-vermittelte Transaktivierung nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich zur Myc-abhängigen Transaktivierung von E-Box-haltigen Genen, z. B. beteiligt an Translation und RNA-Prozessierung, und der Miz1-vermittelten transkriptionellen Aktivierung von Genen mit Miz1-Motiv (z. B. involviert in Autophagie), konnte entgegen dem Modell der generellen Genamplifikation durch Myc eine Myc/Miz1-abhängige Repression von Zielgenen belegt werden. Die neu gewonnenen Erkenntnisse des Bindeverhaltens des Myc/Miz1-Komplexes und der daraus resultierenden transkriptionellen Regulation von Myc/Miz1-Zielgenen ermöglichen ein besseres Verständnis der Myc-Funktion in Tumorzellen und könnte zur Verbesserung von Tumorthapien führen.

6.2. English Summary

Deregulation of the transcription factor Myc is a characteristic feature of a variety of human tumors. The Myc-dependent transcriptional activation of genes involved in metabolism, translation and proliferation therefor promotes tumor growth. Additionally, Myc forms a complex with the zinc finger protein Miz1, which represses transcription of target genes. So far, only a limited number of Myc/Miz1-repressed genes is known. Within the present thesis DNA binding sites of Myc and Miz1 were mapped genome-wide using chromatin immunoprecipitations followed by high-throughput sequencing in a cervical cancer cell line.

It could be shown that Myc binds to promoters of all three RNA polymerases as well as to enhancer regions, whereas Miz1 binding sites could be found only in core promoters of RNA polymerase II and III transcribed genes. reChIP experiments illustrated binding of Myc and Miz1 as a complex on DNA. Additionally, a DNA binding motif of Miz1 was identified and furthermore it was possible to verify the transactivating influence of Miz1 on genes carrying that motif in the promoter. On E-box containing promoters the predominantly existence of Myc/Max complexes resulted in transactivation of the respective genes. Otherwise, transcriptional repression of Myc/Miz1 target genes occurred at promoters where the Myc/Miz1 complex dominates.

Recent publications have illustrated that after mitogenic stimulation of primary lymphocytes, Myc expression is enhanced, whereby Myc serves as a general transcriptional activator that induces the expression of virtually all genes. Although Myc levels are high in tumor cells that general mechanism of Myc-mediated transactivation could not be verified. Additionally to the Myc-dependent transactivation of E-box-containing genes, e. g. involved in translation and RNA processing, and Miz1-mediated transcriptional activation of genes containing a Miz1 binding motif (e. g. autophagy-related genes), and in opposition to the general amplifier model a Myc/Miz1-dependent repression of target genes could be proven. The obtained evidences concerning DNA binding properties of the Myc/Miz1 complex as well as the resulting transcriptional regulation of Myc/Miz1 target genes facilitates a better understanding of Myc function in tumor cells and could lead to better anti-tumor therapies.

7. Literaturverzeichnis

Acosta JC, Ferrandiz N, Bretones G, Torrano V, Blanco R, Richard C, O'Connell B, Sedivy J, Delgado MD, Leon J (2008) Myc inhibits p27-induced erythroid differentiation of leukemia cells by repressing erythroid master genes without reversing p27-mediated cell cycle arrest. *Molecular and cellular biology* **28**: 7286-7295

Adhikary S, Marinoni F, Hock A, Hulleman E, Popov N, Beier R, Bernard S, Quarto M, Capra M, Goettig S, Kogel U, Scheffner M, Helin K, Eilers M (2005) The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell* **123**: 409-421

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. *Molecular and cellular biology* **23**: 7648-7657

Agrawal P, Yu K, Salomon AR, Sedivy JM (2010) Proteomic profiling of Myc-associated proteins. *Cell cycle* **9**: 4908-4921

Albagli O, Dhordain P, Deweindt C, Lecocq G, Leprince D (1995) The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* **6**: 1193-1198

Alitalo K, Ramsay G, Bishop JM, Pfeifer SO, Colby WW, Levinson AD (1983) Identification of nuclear proteins encoded by viral and cellular myc oncogenes. *Nature* **306**: 274-277

Alvarez E, Northwood IC, Gonzalez FA, Latour DA, Seth A, Abate C, Curran T, Davis RJ (1991) Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. Characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **266**: 15277-15285

Arabi A, Wu S, Ridderstrale K, Bierhoff H, Shiue C, Fatyol K, Fahlen S, Hydbring P, Soderberg O, Grummt I, Larsson LG, Wright AP (2005) c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nature cell biology* **7**: 303-310

Baena E, Gandarillas A, Vallespinos M, Zanet J, Bachs O, Redondo C, Fabregat I, Martinez AC, de Alboran IM (2005) c-Myc regulates cell size and ploidy but is not essential for postnatal proliferation in liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 7286-7291

Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research* **37**: W202-208

Baranello L, Levens D, Gupta A, Kouzine F (2012) The importance of being supercoiled: how DNA mechanics regulate dynamic processes. *Biochimica et biophysica acta* **1819**: 632-638

Bardwell VJ, Treisman R (1994) The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes & development* **8**: 1664-1677

Barski A, Chepelev I, Liko D, Cuddapah S, Fleming AB, Birch J, Cui K, White RJ, Zhao K (2010) Pol II and its associated epigenetic marks are present at Pol III-transcribed noncoding RNA genes. *Nature structural & molecular biology* **17**: 629-634

Basu S, Liu Q, Qiu Y, Dong F (2009) Gfi-1 represses CDKN2B encoding p15INK4B through interaction with Miz-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 1433-1438

Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA (2008) An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature genetics* **40**: 499-507

Bernard D, Bedard M, Bilodeau J, Lavigne P (2013) Structural and dynamical characterization of the Miz-1 zinc fingers 5-8 by solution-state NMR. *Journal of biomolecular NMR* **57**: 103-116

Bild AH, Yao G, Chang JT, Wang Q, Potti A, Chasse D, Joshi MB, Harpole D, Lancaster JM, Berchuck A, Olson JA, Jr., Marks JR, Dressman HK, West M, Nevins JR (2006) Oncogenic pathway signatures in human cancers as a guide to targeted therapies. *Nature* **439**: 353-357

Blackwell TK, Huang J, Ma A, Kretzner L, Alt FW, Eisenman RN, Weintraub H (1993) Binding of myc proteins to canonical and noncanonical DNA sequences. *Molecular and cellular biology* **13**: 5216-5224

Blackwell TK, Kretzner L, Blackwood EM, Eisenman RN, Weintraub H (1990) Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* **250**: 1149-1151

Blackwood EM, Eisenman RN (1991) Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* **251**: 1211-1217

Blankenberg D, Von Kuster G, Coraor N, Ananda G, Lazarus R, Mangan M, Nekrutenko A, Taylor J (2010) Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M Ausubel [et al]* **Chapter 19**: Unit 19 10 11-21

Boon K, Caron HN, van Asperen R, Valentijn L, Hermus MC, van Sluis P, Roobeek I, Weis I, Voute PA, Schwab M, Versteeg R (2001) N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *The EMBO journal* **20**: 1383-1393

Bouchard C, Dittrich O, Kiermaier A, Dohmann K, Menkel A, Eilers M, Luscher B (2001) Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes & development* **15**: 2042-2047

Bouchard C, Marquardt J, Bras A, Medema RH, Eilers M (2004) Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *The EMBO journal* **23**: 2830-2840

Brenner C, Deplus R, Didelot C, Lorient A, Vire E, De Smet C, Gutierrez A, Danovi D, Bernard D, Boon T, Pelicci PG, Amati B, Kouzarides T, de Launoit Y, Di Croce L, Fuks F (2005) Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *The EMBO journal* **24**: 336-346

Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM (1984) Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* **224**: 1121-1124

Brooks TA, Hurley LH (2009) The role of supercoiling in transcriptional control of MYC and its importance in molecular therapeutics. *Nature reviews Cancer* **9**: 849-861

Chaillou T, Lee JD, England JH, Esser KA, McCarthy JJ (2013) Time course of gene expression during mouse skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol (1985)* **115**: 1065-1074

Collins S, Groudine M (1982) Amplification of endogenous myc-related DNA sequences in a human myeloid leukaemia cell line. *Nature* **298**: 679-681

Conacci-Sorrell M, McFerrin L, Eisenman RN (2014) An overview of MYC and its interactome. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **4**: a014357

Creyghton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato MA, Frampton GM, Sharp PA, Boyer LA, Young RA, Jaenisch R (2010) Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 21931-21936

Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM (1982) Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**: 7824-7827

Dang CV, McGuire M, Buckmire M, Lee WM (1989) Involvement of the 'leucine zipper' region in the oligomerization and transforming activity of human c-myc protein. *Nature* **337**: 664-666

Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F (2006) The c-Myc target gene network. *Seminars in cancer biology* **16**: 253-264

Deepak S, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, Iwahashi H, Masuo Y, Agrawal G (2007) Real-Time PCR: Revolutionizing detection and expression analysis of genes. *Curr Genomics* **8**: 234-251

Eberhardy SR, D'Cunha CA, Farnham PJ (2000) Direct examination of histone acetylation on Myc target genes using chromatin immunoprecipitation. *The Journal of biological chemistry* **275**: 33798-33805

Edgar R, Domrachev M, Lash AE (2002) Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic acids research* **30**: 207-210

Etard C, Gradl D, Kunz M, Eilers M, Wedlich D (2005) Pontin and Reptin regulate cell proliferation in early *Xenopus* embryos in collaboration with c-Myc and Miz-1. *Mechanisms of development* **122**: 545-556

Faiola F, Liu X, Lo S, Pan S, Zhang K, Lyman E, Farina A, Martinez E (2005) Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription. *Molecular and cellular biology* **25**: 10220-10234

Felton-Edkins ZA, Kenneth NS, Brown TR, Daly NL, Gomez-Roman N, Grandori C, Eisenman RN, White RJ (2003) Direct regulation of RNA polymerase III transcription by RB, p53 and c-Myc. *Cell cycle* **2**: 181-184

Feng XH, Liang YY, Liang M, Zhai W, Lin X (2002) Direct interaction of c-Myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGF-beta-mediated induction of the CDK inhibitor p15(Ink4B). *Molecular cell* **9**: 133-143

Fernandez M, Miranda-Saavedra D (2012) Genome-wide enhancer prediction from epigenetic signatures using genetic algorithm-optimized support vector machines. *Nucleic acids research* **40**: e77

Fernandez PC, Frank SR, Wang L, Schroeder M, Liu S, Greene J, Cocito A, Amati B (2003) Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes & development* **17**: 1115-1129

Frank SR, Parisi T, Taubert S, Fernandez P, Fuchs M, Chan HM, Livingston DM, Amati B (2003) MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO reports* **4**: 575-580

Gallant P, Shii Y, Cheng PF, Parkhurst SM, Eisenman RN (1996) Myc and Max homologs in *Drosophila*. *Science* **274**: 1523-1527

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 4510-4515

Gaubatz S, Imhof A, Dosch R, Werner O, Mitchell P, Buettner R, Eilers M (1995) Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2. *The EMBO journal* **14**: 1508-1519

Gaubatz S, Meichle A, Eilers M (1994) An E-box element localized in the first intron mediates regulation of the prothymosin alpha gene by c-myc. *Molecular and cellular biology* **14**: 3853-3862

Gebhardt A, Frye M, Herold S, Benitah SA, Braun K, Samans B, Watt FM, Elsasser HP, Eilers M (2006) Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. *The Journal of cell biology* **172**: 139-149

Gebhardt A, Kosan C, Herkert B, Moroy T, Lutz W, Eilers M, Elsasser HP (2007) Miz1 is required for hair follicle structure and hair morphogenesis. *Journal of cell science* **120**: 2586-2593

Giardine B, Riemer C, Hardison RC, Burhans R, Elnitski L, Shah P, Zhang Y, Blankenberg D, Albert I, Taylor J, Miller W, Kent WJ, Nekrutenko A (2005) Galaxy: a platform for interactive large-scale genome analysis. *Genome research* **15**: 1451-1455

Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J, Galaxy T (2010) Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome biology* **11**: R86

Gomez-Roman N, Grandori C, Eisenman RN, White RJ (2003) Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* **421**: 290-294

Grandori C, Gomez-Roman N, Felton-Edkins ZA, Ngouenet C, Galloway DA, Eisenman RN, White RJ (2005) c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nature cell biology* **7**: 311-318

Grewal SS, Li L, Orian A, Eisenman RN, Edgar BA (2005) Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during Drosophila development. *Nature cell biology* **7**: 295-302

Haggerty TJ, Zeller KI, Osthus RC, Wonsey DR, Dang CV (2003) A strategy for identifying transcription factor binding sites reveals two classes of genomic c-Myc target sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 5313-5318

Hannon GJ, Beach D (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* **371**: 257-261

Heintzman ND, Stuart RK, Hon G, Fu Y, Ching CW, Hawkins RD, Barrera LO, Van Calcar S, Qu C, Ching KA, Wang W, Weng Z, Green RD, Crawford GE, Ren B (2007) Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nature genetics* **39**: 311-318

Herkert B, Dwertmann A, Herold S, Abed M, Naud JF, Finkernagel F, Harms GS, Orian A, Wanzel M, Eilers M (2010) The Arf tumor suppressor protein inhibits Miz1 to suppress cell adhesion and induce apoptosis. *The Journal of cell biology* **188**: 905-918

Hermeking H, Rago C, Schuhmacher M, Li Q, Barrett JF, Obaya AJ, O'Connell BC, Mateyak MK, Tam W, Kohlhuber F, Dang CV, Sedivy JM, Eick D, Vogelstein B, Kinzler KW (2000) Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 2229-2234

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. *Molecular cell* **10**: 509-521

Honnemann J, Sanz-Moreno A, Wolf E, Eilers M, Elsasser HP (2012) Miz1 is a critical repressor of cdkn1a during skin tumorigenesis. *PLoS one* **7**: e34885

Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009a) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research* **37**: 1-13

Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009b) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* **4**: 44-57

Iritani BM, Eisenman RN (1999) c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 13180-13185

Izumi H, Molander C, Penn LZ, Ishisaki A, Kohno K, Funa K (2001) Mechanism for the transcriptional repression by c-Myc on PDGF beta-receptor. *Journal of cell science* **114**: 1533-1544

Ji X, Li W, Song J, Wei L, Liu XS (2006) CEAS: cis-regulatory element annotation system. *Nucleic acids research* **34**: W551-554

Johnson SA, Dubeau L, Johnson DL (2008) Enhanced RNA polymerase III-dependent transcription is required for oncogenic transformation. *The Journal of biological chemistry* **283**: 19184-19191

Karolchik D, Hinrichs AS, Furey TS, Roskin KM, Sugnet CW, Haussler D, Kent WJ (2004) The UCSC Table Browser data retrieval tool. *Nucleic acids research* **32**: D493-496

Kenneth NS, Ramsbottom BA, Gomez-Roman N, Marshall L, Cole PA, White RJ (2007) TRRAP and GCN5 are used by c-Myc to activate RNA polymerase III transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 14917-14922

Kim S, Li Q, Dang CV, Lee LA (2000) Induction of ribosomal genes and hepatocyte hypertrophy by adenovirus-mediated expression of c-Myc in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 11198-11202

Kim YH, Girard L, Giacomini CP, Wang P, Hernandez-Boussard T, Tibshirani R, Minna JD, Pollack JR (2006) Combined microarray analysis of small cell lung cancer reveals altered apoptotic balance and distinct expression signatures of MYC family gene amplification. *Oncogene* **25**: 130-138

Knoepfler PS, Zhang XY, Cheng PF, Gafken PR, McMahon SB, Eisenman RN (2006) Myc influences global chromatin structure. *The EMBO journal* **25**: 2723-2734

Koch HB, Zhang R, Verdoodt B, Bailey A, Zhang CD, Yates JR, 3rd, Menssen A, Hermeking H (2007) Large-scale identification of c-MYC-associated proteins using a combined TAP/MudPIT approach. *Cell cycle* **6**: 205-217

Kohl NE, Kanda N, Schreck RR, Bruns G, Latt SA, Gilbert F, Alt FW (1983) Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell* **35**: 359-367

Kosan C, Saba I, Godmann M, Herold S, Herkert B, Eilers M, Moroy T (2010) Transcription factor miz-1 is required to regulate interleukin-7 receptor signaling at early commitment stages of B cell differentiation. *Immunity* **33**: 917-928

Kouzine F, Gupta A, Baranello L, Wojtowicz D, Ben-Aissa K, Liu J, Przytycka TM, Levens D (2013) Transcription-dependent dynamic supercoiling is a short-range genomic force. *Nature structural & molecular biology* **20**: 396-403

Kouzine F, Levens D (2007) Supercoil-driven DNA structures regulate genetic transactions. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **12**: 4409-4423

Kouzine F, Liu J, Sanford S, Chung HJ, Levens D (2004) The dynamic response of upstream DNA to transcription-generated torsional stress. *Nature structural & molecular biology* **11**: 1092-1100

Kouzine F, Sanford S, Elisha-Feil Z, Levens D (2008) The functional response of upstream DNA to dynamic supercoiling in vivo. *Nature structural & molecular biology* **15**: 146-154

Kurland JF, Tansey WP (2008) Myc-mediated transcriptional repression by recruitment of histone deacetylase. *Cancer research* **68**: 3624-3629

Kuznetsov VA, Singh O, Jenjaroenpun P (2010) Statistics of protein-DNA binding and the total number of binding sites for a transcription factor in the mammalian genome. *BMC genomics* **11 Suppl 1**: S12

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Langmead B (2010) Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D Baxevanis [et al]* **Chapter 11**: Unit 11 17

Lee BK, Bhinge AA, Battenhouse A, McDaniel RM, Liu Z, Song L, Ni Y, Birney E, Lieb JD, Furey TS, Crawford GE, Iyer VR (2012) Cell-type specific and combinatorial usage of diverse transcription factors revealed by genome-wide binding studies in multiple human cells. *Genome research* **22**: 9-24

Lee HG, Chen Q, Wolfram JA, Richardson SL, Liner A, Siedlak SL, Zhu X, Ziats NP, Fujioka H, Felsher DW, Castellani RJ, Valencik ML, McDonald JA, Hoit BD, Lesnefsky EJ, Smith MA (2009) Cell cycle re-entry and mitochondrial defects in myc-mediated hypertrophic cardiomyopathy and heart failure. *PloS one* **4**: e7172

Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, Genome Project Data Processing S (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**: 2078-2079

Li Z, Van Calcar S, Qu C, Cavenee WK, Zhang MQ, Ren B (2003) A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 8164-8169

Lin CY, Loven J, Rahl PB, Paranal RM, Burge CB, Bradner JE, Lee TI, Young RA (2012) Transcriptional amplification in tumor cells with elevated c-Myc. *Cell* **151**: 56-67

Liu LF, Wang JC (1978) DNA-DNA gyrase complex: the wrapping of the DNA duplex outside the enzyme. *Cell* **15**: 979-984

Liu Q, Basu S, Qiu Y, Tang F, Dong F (2010) A role of Miz-1 in Gfi-1-mediated transcriptional repression of CDKN1A. *Oncogene* **29**: 2843-2852

Lu H, Zawel L, Fisher L, Egly JM, Reinberg D (1992) Human general transcription factor IIIH phosphorylates the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Nature* **358**: 641-645

Marshall GM, Gherardi S, Xu N, Neiron Z, Trahair T, Scarlett CJ, Chang DK, Liu PY, Jankowski K, Iraci N, Haber M, Norris MD, Keating J, Sekyere E, Jonquieres G, Stossi F, Katzenellenbogen BS, Biankin AV, Perini G, Liu T (2010) Transcriptional upregulation of histone deacetylase 2 promotes Myc-induced oncogenic effects. *Oncogene* **29**: 5957-5968

McMahon SB, Van Buskirk HA, Dugan KA, Copeland TD, Cole MD (1998) The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* **94**: 363-374

McMahon SB, Wood MA, Cole MD (2000) The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Molecular and cellular biology* **20**: 556-562

Meyuhas O (2000) Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**: 6321-6330

Michelotti EF, Tomonaga T, Krutzsch H, Levens D (1995) Cellular nucleic acid binding protein regulates the CT element of the human c-myc protooncogene. *The Journal of biological chemistry* **270**: 9494-9499

Muller J, Samans B, van Riggelen J, Faga G, Peh KNR, Wei CL, Muller H, Amati B, Felsher D, Eilers M (2010) TGFbeta-dependent gene expression shows that senescence correlates with abortive differentiation along several lineages in Myc-induced lymphomas. *Cell cycle* **9**: 4622-4626

Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM (1996) Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 11382-11388

Ni M, Chen Y, Fei T, Li D, Lim E, Liu XS, Brown M (2013) Amplitude modulation of androgen signaling by c-MYC. *Genes & development* **27**: 734-748

Nicol JW, Helt GA, Blanchard SG, Jr., Raja A, Loraine AE (2009) The Integrated Genome Browser: free software for distribution and exploration of genome-scale datasets. *Bioinformatics* **25**: 2730-2731

Nie Z, Hu G, Wei G, Cui K, Yamane A, Resch W, Wang R, Green DR, Tessarollo L, Casellas R, Zhao K, Levens D (2012) c-Myc is a universal amplifier of expressed genes in lymphocytes and embryonic stem cells. *Cell* **151**: 68-79

Park J, Kunjibettu S, McMahon SB, Cole MD (2001) The ATM-related domain of TRRAP is required for histone acetyltransferase recruitment and Myc-dependent oncogenesis. *Genes & development* **15**: 1619-1624

Parvin JD, Sharp PA (1993) DNA topology and a minimal set of basal factors for transcription by RNA polymerase II. *Cell* **73**: 533-540

Patel JH, McMahon SB (2006) Targeting of Miz-1 is essential for Myc-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **281**: 3283-3289

Pendergast AM, Muller AJ, Havlik MH, Maru Y, Witte ON (1991) BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell* **66**: 161-171

Perna D, Faga G, Verrecchia A, Gorski MM, Barozzi I, Narang V, Khng J, Lim KC, Sung WK, Sanges R, Stupka E, Oskarsson T, Trumpp A, Wei CL, Muller H, Amati B (2012) Genome-wide mapping of Myc binding and gene regulation in serum-stimulated fibroblasts. *Oncogene* **31**: 1695-1709

Perry RP (2005) The architecture of mammalian ribosomal protein promoters. *BMC evolutionary biology* **5**: 15

Persikov AV, Singh M (2014) De novo prediction of DNA-binding specificities for Cys2His2 zinc finger proteins. *Nucleic acids research* **42**: 97-108

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

Pfeifer K, Prezant T, Guarente L (1987) Yeast HAP1 activator binds to two upstream activation sites of different sequence. *Cell* **49**: 19-27

Phan RT, Saito M, Basso K, Niu H, Dalla-Favera R (2005) BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nature immunology* **6**: 1054-1060

Poortinga G, Hannan KM, Snelling H, Walkley CR, Jenkins A, Sharkey K, Wall M, Brandenburger Y, Palatsides M, Pearson RB, McArthur GA, Hannan RD (2004) MAD1 and c-MYC regulate UBF and rDNA transcription during granulocyte differentiation. *The EMBO journal* **23**: 3325-3335

Quinlan AR, Hall IM (2010) BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**: 841-842

Raha D, Wang Z, Moqtaderi Z, Wu L, Zhong G, Gerstein M, Struhl K, Snyder M (2010) Close association of RNA polymerase II and many transcription factors with Pol III genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 3639-3644

Rahl PB, Lin CY, Seila AC, Flynn RA, McCuine S, Burge CB, Sharp PA, Young RA (2010) c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell* **141**: 432-445

Ramanathan Y, Rajpara SM, Reza SM, Lees E, Shuman S, Mathews MB, Pe'ery T (2001) Three RNA polymerase II carboxyl-terminal domain kinases display distinct substrate preferences. *The Journal of biological chemistry* **276**: 10913-10920

Revyakin A, Ebright RH, Strick TR (2004) Promoter unwinding and promoter clearance by RNA polymerase: detection by single-molecule DNA nanomanipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 4776-4780

Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J (1995) Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes & development* **9**: 1831-1845

Roca J (2011) The torsional state of DNA within the chromosome. *Chromosoma* **120**: 323-334

Roy AL, Carruthers C, Gutjahr T, Roeder RG (1993) Direct role for Myc in transcription initiation mediated by interactions with TFII-I. *Nature* **365**: 359-361

Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology* **132**: 365-386

Saito M, Novak U, Piovan E, Basso K, Sumazin P, Schneider C, Crespo M, Shen Q, Bhagat G, Califano A, Chadburn A, Pasqualucci L, Dalla-Favera R (2009) BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 11294-11299

Saldanha AJ (2004) Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics* **20**: 3246-3248

Salghetti SE, Kim SY, Tansey WP (1999) Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *The EMBO journal* **18**: 717-726

Sandhu C, Garbe J, Bhattacharya N, Daksis J, Pan CH, Yaswen P, Koh J, Slingerland JM, Stampfer MR (1997) Transforming growth factor beta stabilizes p15INK4B protein, increases p15INK4B-cdk4 complexes, and inhibits cyclin D1-cdk4 association in human mammary epithelial cells. *Molecular and cellular biology* **17**: 2458-2467

Schlosser I, Holzel M, Hoffmann R, Burtscher H, Kohlhuber F, Schuhmacher M, Chapman R, Weidle UH, Eick D (2005) Dissection of transcriptional programmes in response to serum and c-Myc in a human B-cell line. *Oncogene* **24**: 520-524

Schuhmacher M, Kohlhuber F, Holzel M, Kaiser C, Burtscher H, Jarsch M, Bornkamm GW, Laux G, Polack A, Weidle UH, Eick D (2001) The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. *Nucleic acids research* **29**: 397-406

Schuhmacher M, Staeger MS, Pajic A, Polack A, Weidle UH, Bornkamm GW, Eick D, Kohlhuber F (1999) Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Current biology : CB* **9**: 1255-1258

Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR (2000) Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes & development* **14**: 2501-2514

Seitz V, Butzhammer P, Hirsch B, Hecht J, Gutgemann I, Ehlers A, Lenze D, Oker E, Sommerfeld A, von der Wall E, Konig C, Zinser C, Spang R, Hummel M (2011) Deep sequencing of MYC DNA-binding sites in Burkitt lymphoma. *PloS one* **6**: e26837

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

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

Sheiness D, Fanshier L, Bishop JM (1978) Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. *Journal of virology* **28**: 600-610

Si J, Yu X, Zhang Y, DeWille JW (2010) Myc interacts with Max and Miz1 to repress C/EBPdelta promoter activity and gene expression. *Molecular cancer* **9**: 92

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. *Nature cell biology* **3**: 392-399

Stead MA, Trinh CH, Garnett JA, Carr SB, Baron AJ, Edwards TA, Wright SC (2007) A beta-sheet interaction interface directs the tetramerisation of the Miz-1 POZ domain. *Journal of molecular biology* **373**: 820-826

Steinmann S, Schulte K, Beck K, Chachra S, Bujnicki T, Klempnauer KH (2009) v-Myc inhibits C/EBPbeta activity by preventing C/EBPbeta-induced phosphorylation of the co-activator p300. *Oncogene* **28**: 2446-2455

Stone J, de Lange T, Ramsay G, Jakobovits E, Bishop JM, Varmus H, Lee W (1987) Definition of regions in human c-myc that are involved in transformation and nuclear localization. *Molecular and cellular biology* **7**: 1697-1709

Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 15545-15550

Taira T, Sawai M, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Arigo SM, Ariga H (1999) Cell cycle-dependent switch of up-and down-regulation of human hsp70 gene expression by interaction between c-Myc and CBF/NF-Y. *The Journal of biological chemistry* **274**: 24270-24279

Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, Tronick S, Aaronson S, Leder P (1982) Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**: 7837-7841

Tomonaga T, Levens D (1996) Activating transcription from single stranded DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 5830-5835

Uribealgo I, Buschbeck M, Gutierrez A, Teichmann S, Demajo S, Kuebler B, Nomdedeu JF, Martin-Caballero J, Roma G, Benitah SA, Di Croce L (2011) E-box-independent regulation of transcription and differentiation by MYC. *Nature cell biology* **13**: 1443-1449

van Riggelen J, Muller J, Otto T, Beuger V, Yetil A, Choi PS, Kosan C, Moroy T, Felsher DW, Eilers M (2010) The interaction between Myc and Miz1 is required to antagonize TGFbeta-dependent autocrine signaling during lymphoma formation and maintenance. *Genes & development* **24**: 1281-1294

Vennstrom B, Sheiness D, Zabielski J, Bishop JM (1982) Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *Journal of virology* **42**: 773-779

Vita M, Henriksson M (2006) The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Seminars in cancer biology* **16**: 318-330

von Walden F, Casagrande V, Ostlund Farrants AK, Nader GA (2012) Mechanical loading induces the expression of a Pol I regulon at the onset of skeletal muscle hypertrophy. *American journal of physiology Cell physiology* **302**: C1523-1530

Wang J, Zhuang J, Iyer S, Lin X, Whitfield TW, Greven MC, Pierce BG, Dong X, Kundaje A, Cheng Y, Rando OJ, Birney E, Myers RM, Noble WS, Snyder M, Weng Z (2012) Sequence features and chromatin structure around the genomic regions bound by 119 human transcription factors. *Genome research* **22**: 1798-1812

Walz S, Lorenzin F, Morton J, Wiese KE, von Eyss B, Herold S, Rycak L, Dumay-Odelot H, Karim S, Bartkuhn M, Roels F, Wuestefeld T, Fischer M, Teichmann M, Zender L, Wei C-L, Sansom O, Wolf E and Eilers M (2014) Activation and repression by oncogenic Myc shape tumour-specific gene expression profiles. *Nature*, in press

Wang SX, Elder PK, Zheng Y, Strauch AR, Kelm RJ, Jr. (2005) Cell cycle-mediated regulation of smooth muscle alpha-actin gene transcription in fibroblasts and vascular smooth muscle cells involves multiple adenovirus E1A-interacting cofactors. *The Journal of biological chemistry* **280**: 6204-6214

Wanzel M, Russ AC, Kleine-Kohlbrecher D, Colombo E, Pelicci PG, Eilers M (2008) A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Miz1 function with cell growth. *Nature cell biology* **10**: 1051-1061

Watson DK, Psallidopoulos MC, Samuel KP, Dalla-Favera R, Papas TS (1983) Nucleotide sequence analysis of human c-myc locus, chicken homologue, and myelocytomatosis virus MC29 transforming gene reveals a highly conserved gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**: 3642-3645

Weber A, Marquardt J, Elzi D, Forster N, Starke S, Glaum A, Yamada D, Defossez PA, Delrow J, Eisenman RN, Christiansen H, Eilers M (2008) Zbtb4 represses transcription of P21CIP1 and controls the cellular response to p53 activation. *The EMBO journal* **27**: 1563-1574

Whitelaw PF, Hesketh JE (1992) Expression of c-myc and c-fos in rat skeletal muscle. Evidence for increased levels of c-myc mRNA during hypertrophy. *The Biochemical journal* **281 (Pt 1)**: 143-147

Wiese KE, Haikala H, von Eyss B, Wolf E, Esnault C, Rosenwald A, Treisman R, Klefstrom J, Eilers M (2014) Miz1-mediated repression of serum-response factor (SRF)-activated target genes is critical for Myc-dependent apoptosis of epithelia cells. *Genes Dev*, eingereicht.

Wolf E, Gebhardt A, Kawauchi D, Walz S, von Eyss B, Wagner N, Renninger C, Krohne G, Asan E, Roussel MF, Eilers M (2013) Miz1 is required to maintain autophagic flux. *Nature communications* **4**: 2535

Wood MA, McMahon SB, Cole MD (2000) An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Molecular cell* **5**: 321-330

Wu CH, Sahoo D, Arvanitis C, Bradon N, Dill DL, Felsher DW (2008) Combined analysis of murine and human microarrays and ChIP analysis reveals genes associated with the ability of MYC to maintain tumorigenesis. *PLoS genetics* **4**: e1000090

Yan J, Enge M, Whittington T, Dave K, Liu J, Sur I, Schmierer B, Jolma A, Kivioja T, Taipale M, Taipale J (2013) Transcription factor binding in human cells occurs in dense clusters formed around cohesin anchor sites. *Cell* **154**: 801-813

Ye T, Krebs AR, Choukallah MA, Keime C, Plewniak F, Davidson I, Tora L (2011) seqMINER: an integrated ChIP-seq data interpretation platform. *Nucleic acids research* **39**: e35

Zeller KI, Jegga AG, Aronow BJ, O'Donnell KA, Dang CV (2003) An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome biology* **4**: R69

Zeller KI, Zhao X, Lee CW, Chiu KP, Yao F, Yustein JT, Ooi HS, Orlov YL, Shahab A, Yong HC, Fu Y, Weng Z, Kuznetsov VA, Sung WK, Ruan Y, Dang CV, Wei CL (2006) Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 17834-17839

Zhang J, Lou X, Yang S, He S, Yang L, Liu M, Zhu H, Shan Q, Su S, Zhan Q, Xu N, Liu S (2012) BAG2 is a target of the c-Myc gene and is involved in cellular senescence via the p21(CIP1) pathway. *Cancer letters* **318**: 34-41

Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, Liu XS (2008) Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome biology* **9**: R137

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
B2M	Beta-2-Mikroglobulin
BL21	Bakterienstamm zur Expression von GST-Fusionsproteinen
BSA	bovines Serumalbumin
BTB/POZ	<i>poxvirus and zinc finger/bric-à-brac, tramtrack and broad complex</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
<i>CDKN1A</i>	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1A (p21)</i>
<i>CDKN2B</i>	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2B (p15)</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
CEAS	<i>cis-regulatory element annotation system</i>
<i>C/EBPα</i>	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>
CentriMO	<i>central motif enrichment analysis</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
ChIP-Seq	Chromatin-Immunpräzipitation-Sequenzierung
Ci	Curie; Einheit der Aktivität eines radioaktiven Stoffes
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DH5 α	Bakterienstamm zur Herstellung und Amplifikation von DNA-Plasmiden
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphat-Gemisch
DOC	<i>deoxycholate</i> ; Natriumdeoxycholat
DTT	Dithiothreitol

E-Box	<i>Enhancer-Box</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> ; Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>
ENCODE	<i>encyclopedia of DNA elements</i>
EtOH	Ethanol
ETS	<i>E-twenty six</i>
ETS	<i>external transcribed spacer</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i> ; fötales Kälberserum
f	<i>forward</i> ; 5'-Primer
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FC	<i>fold change</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
FSC	<i>forward light scatter</i> ; Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
gt	<i>goat</i>
G	Guanin
G	Glycin
GEO	<i>gene expression omnibus</i>
GO	<i>gene ontology</i>
GSEA	<i>gene set enrichment analysis</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
H3K4me3	Trimethyl-Lysin 4 in Histon 3
h	Stunde(n)
H	Histon
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
hg19	Humanes Genom, Zusammenbau 19
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
hygro	Hygromycin
IgG	Immunglobulin G
<i>INO80</i>	<i>INO80 complex subunit</i>
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
IPTG	Isopropyl-®-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Ktr	Kontrolle

I	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i> ; Nährmedium zur Bakterienkultur
LOWESS	<i>locally weighed polynomial regression</i> ; lokal gewichtete Polynominalregression
LPS	Lipopolysaccharid
LV	Leervektor
m	milli
MSigDB	<i>molecular signature database</i>
μ	mikro
M	molar
MACS	<i>Model-based analysis of ChIP-seq</i>
MAST	<i>motif alignment and search tool</i>
MAX	<i>Myc associated factor X</i>
MCC	<i>Matthews correlation coefficient</i>
MEME	<i>multiple Em for motif elicitation</i>
MIBS	Miz1-Bindesequenz
min	Minute(n)
<i>MIZ1</i>	<i>Myc interacting Zinc finger protein 1</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i> ; Boten-RNA
<i>MYC</i>	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
n	nano
n	Probenanzahl
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NES	<i>normalised enrichment score</i>
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
NPC	<i>neuronal precursor cell</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
NV	nicht vorhanden
<i>p300</i>	<i>E1A binding protein p300</i>
p	pico
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
Pol	Polymerase
puro	Puromycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid

qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-PCR
r	<i>reverse</i> ; 3'-Primer
rb	<i>rabbit</i> ; Kaninchen
rDNA	ribosomale RNA
RIPA	<i>radio immunoprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
sec	Sekunde(n)
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
shRNA	<i>short hairpin RNA</i> ; Haarnadel-RNA
snRNA	small nuclear RNA
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
SVM	<i>support vector machine</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Azetat/EDTA-Puffer
TBS	<i>tris buffered saline</i> ; Tris-gepufferte Lösung
TBS-T	<i>tris buffered saline with Tween-20</i> ; Tris-gepufferte Lösung mit Tween-20
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	<i>transfer RNA</i> , Transfer-RNA
TSS	Transkriptionsstartstelle
U	<i>unit</i> (Aktivitätseinheit von Enzymen)
UCSC	<i>University of California, Santa Cruz</i>
V	Volt
VAMP4	<i>Vesicle-associated membrane protein 4</i>
v/v	<i>volume/volume</i> ; Volumen pro Volumeneinheit
w/v	<i>weight/volume</i> ; Gewicht pro Volumeneinheit
z. B.	zum Beispiel

8.2. In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Anwendung
<i>ABCB6-f</i>	GGACCAAGATGTGGAAAGGA	ChIP
<i>ABCB6-r</i>	CCAAAATCTCGCCAGGTAGA	ChIP
<i>ACTB-f</i>	CGTTCCGAAAGTTGCCTTTT	ChIP
<i>ACTB-r</i>	GCCGCTGGGTTTTATAGGG	ChIP
<i>ATG5-f</i>	CAAGCTCTAGGGAGGCAGTG	ChIP
<i>ATG5-r</i>	TGAGAATCTTGCGTCAAAGC	ChIP
<i>ATP5I-f</i>	GAAGCAGGATGAACTGAAACG	ChIP
<i>ATP5I-r</i>	GTCGCAGGGTCACTCACTTT	ChIP
<i>BCAP31-f</i>	TCTAAGGACCCCTGGCTTC	ChIP
<i>BCAP31-r</i>	CGACTCCTAGAGGGCAGGAT	ChIP
<i>BMP5-f</i>	ATCTTGGGTTTGCCTCACAG	ChIP
<i>BMP5-r</i>	TTCATTGGTCATGGCATTGT	ChIP
<i>CASP8-f</i>	ACCCTGCAGTTCCTTCTGTG	ChIP
<i>CASP8-r</i>	GAAAACACTTCCCTCCAGCA	ChIP
<i>CCDC80-f</i>	GATTTCCAGTGGCTGCTGTT	ChIP
<i>CCDC80-r</i>	CCTGGATTCAGTCCAGAAA	ChIP
<i>CDCA8-f</i>	GGCAGGAACTTGCTTGTGAT	ChIP
<i>CDCA8-r</i>	GAGCGGCTCTACAGTCAACC	ChIP
<i>CDKAL1-f</i>	TGGTGGTGTGCACCTGTAGT	ChIP
<i>CDKAL1-r</i>	TCACAGCTCACTGCAACCTC	ChIP
<i>CEBPB-f</i>	CGGGCTCAGGAGAAACTTTA	ChIP
<i>CEBPB-r</i>	TATTAGTGAGGGGGCTGGTG	ChIP
<i>CITED4-f</i>	CCCGCCTCTGGGTATAAGA	ChIP
<i>CITED4-r</i>	AGCAAAACCAAACCCGACT	ChIP
<i>CLDN12-f</i>	TCCGATTTCTGGGTCTTTTG	ChIP
<i>CLDN12-r</i>	CACAGATGTGGTCAGCGTTT	ChIP
<i>DCLRE1B-f</i>	CCCAACCTCTCACTCTCCAG	ChIP
<i>DCLRE1B-r</i>	AGGCCAAAGTAGCCGATTC	ChIP
<i>DDC-f</i>	GGCAGGCATGCTAATGGTAT	ChIP
<i>DDC-r</i>	AACTGGAATGGTTGCCCTCAG	ChIP
<i>EIF2B3-f</i>	GGCTCCCAATGAGCTTTCTT	ChIP
<i>EIF2B3-r</i>	ACCCAGACGGAACAACCTCAG	ChIP
<i>EIF2C1-f</i>	CCAGTAGAGGTGCCTTGGAA	ChIP
<i>EIF2C1-r</i>	GAGGGACCTATTTGGGGAAA	ChIP
<i>ELP3-f</i>	TTCCACCCTTTCACTTAGGC	ChIP
<i>ELP3-r</i>	GTGGCATCTTGGGGTTAGAA	ChIP
<i>ERCC4-f</i>	TTATTCCACAGCCACTGCAC	ChIP
<i>ERCC4-r</i>	TTTTGCGATTACTCCCCATC	ChIP
<i>FBXW5-f</i>	TTCCACCGACAGTCCCTTAGC	ChIP
<i>FBXW5-r</i>	TTGGCCATGGAGATAAGACC	ChIP

Anhang

<i>FBXW8-f</i>	GTGATAGGCAGCAGAGCTGA	ChIP
<i>FBXW8-r</i>	TGTACGCACGTGGTGGTC	ChIP
<i>FUS-f</i>	CGAAATCCCTGCTGTCTTTC	ChIP
<i>FUS-r</i>	CCTGAGGTTGACTTCGTCGT	ChIP
<i>GSN-f</i>	TTCCTTCCCGGTCTATCTC	ChIP
<i>GSN-r</i>	TGGAAGACGGGAAAAGTGAG	ChIP
<i>GTF3C3-f</i>	GTAGAGACGGGGTTTCACCA	ChIP
<i>GTF3C3-r</i>	CGGGCAAAGTAATCCCAGTA	ChIP
<i>H42.9-f</i>	CCCAGGGGAGGTATATCTTT	ChIP
<i>H42.9-r</i>	CCAACCTCTCCGACGACA	ChIP
<i>HIST1H2AB-f</i>	TCCTCACAGCCTACCTCCAG	ChIP
<i>HIST1H2AB-r</i>	GATAAGGGAAAATCGCCACA	ChIP
<i>HK1-f</i>	GGCACGTCTGAATGGAATTT	ChIP
<i>HK1-r</i>	GCTAGAACAAGCATGCCACA	ChIP
<i>HNRPLL-f</i>	GCGTCCCCATCCTTAGATTC	ChIP
<i>HNRPLL-r</i>	GAGCCAACATTCAGCCTCTC	ChIP
<i>HSPE1-f</i>	CAGTAGTCGCTGTTGGATCG	ChIP
<i>HSPE1-r</i>	AGAACTACTTTGGTGCCTCCAT	ChIP
<i>IFNAR1-f</i>	GCGATCCTGTGAAGGTCAAG	ChIP
<i>IFNAR1-r</i>	CTCACTCTTTCCGGCCTATG	ChIP
<i>IMMT-f</i>	GCCTCACAACTCCAAAAACAA	ChIP
<i>IMMT-r</i>	TTTGAGCCGCTTCTGTAGGT	ChIP
<i>INO80C-f</i>	GACGGAAGTAACAGCGGAAA	ChIP
<i>INO80C-r</i>	TCTTCTTGCTGTTCCGGACT	ChIP
<i>JMJD5-f</i>	TGGATGCAAACAGCCTTGTA	ChIP
<i>JMJD5-r</i>	GGCTGTATCCTCTGGGTCCT	ChIP
<i>LAMP2-f</i>	CTTGGGGAAAACACTGAGGA	ChIP
<i>LAMP2-r</i>	TTCCCTGATCTCAGCAAACC	ChIP
<i>LIN9-f</i>	TGTCACAGCTCCTGCCTCTA	ChIP
<i>LIN9-r</i>	ACCCTCTGACACGGAAACAC	ChIP
<i>LMTK2-f</i>	AGGTGGACAAGAGGCAACAG	ChIP
<i>LMTK2-r</i>	AAACAGCTTTGGGCTTTTCA	ChIP
<i>MACROD1-f</i>	CGAGCGCCGTAAATAGAGTC	ChIP
<i>MACROD1-r</i>	CGGACAGTCGGCTCTGTAG	ChIP
<i>MPHOSPH1-f</i>	ACTGTCAGGAAGTGGGTTGC	ChIP
<i>MPHOSPH1-r</i>	AGCAGTGGAGGCGAGATTTA	ChIP
<i>MRPL49-f</i>	GCATGAACATTATCCTACCCCTA	ChIP
<i>MRPL49-r</i>	TCGTACAAAGTAAGGCAGGTTG	ChIP
<i>MRPL54-f</i>	CTGGGAGGAGGATGTGGTTA	ChIP
<i>MRPL54-r</i>	GGCAGGCAGAGAAACAGAAC	ChIP
<i>MRPS15-f</i>	TAAACGTGGGCACACAACC	ChIP
<i>MRPS15-r</i>	TAGGTGGCGTACTCTGATG	ChIP
<i>MRPS18A-f</i>	GGAGCAAGCGAACTACAACC	ChIP

Anhang

<i>MRPS18A-r</i>	CTACCCTGACCTCTCGTCCA	ChIP
<i>MRPS23-f</i>	GGCCTATCACTTGCTTCTGC	ChIP
<i>MRPS23-r</i>	TAAAGGGCGCATAAGTTGCT	ChIP
<i>MRPS36-f</i>	CTGGCTTCTGGAAAGGAAAT	ChIP
<i>MRPS36-r</i>	ATTGTTTCGTTTTGGGGACA	ChIP
<i>MSLN-f</i>	ACTGACTCCTGGGCTGTCTG	ChIP
<i>MSLN-r</i>	TCTGTGGTACCTGCAGCTTG	ChIP
<i>MTFR1-f</i>	GCCACTCCAGCGTATCTAGC	ChIP
<i>MTFR1-r</i>	CCTCAAAGAGGCATGGGTTA	ChIP
<i>MURC-f</i>	TTTCTTCTTCCCCACCCTTT	ChIP
<i>MURC-r</i>	GCTTCCATCTCTGCAGTTCC	ChIP
<i>NARS2-f</i>	AAGCCTGGGTCAACAAGTACG	ChIP
<i>NARS2-r</i>	GCAACCCTCCTACCACACC	ChIP
Negativregion Chr11-f	TTTTCTCACATTGCCCTGT	ChIP
Negativregion Chr11-r	TCAATGCTGTACCAGGCAAA	ChIP
<i>OAZ2-f</i>	ATATCCTCCCAAATGGCACA	ChIP
<i>OAZ2-r</i>	GCGTGGTGTTTTCCGGTAGTT	ChIP
<i>p21-4-f</i>	CCTGGAGAGTGCCAACTCAT	ChIP
<i>p21-4-r</i>	ACATTTCCCCACGAAGTGAG	ChIP
<i>p21-5-f</i>	CCGAAGTCAGTTCTTGTGG	ChIP
<i>p21-5-r</i>	CGCTCTCTCACCTCCTCTGA	ChIP
<i>PNRC2-f</i>	CGCGTAAAGGGCTCTAATTG	ChIP
<i>PNRC2-r</i>	AAAAGTTGCCTCCCTGTGAA	ChIP
<i>PPRC1-f</i>	AGCGCTCCCTAAATCGGTAT	ChIP
<i>PPRC1-r</i>	CCTTTAAGTGGGGACCGTTT	ChIP
<i>PREB-f</i>	GTTGTACGCGCTTCAGGTC	ChIP
<i>PREB-r</i>	CTCTCACCAGCCATTCTTT	ChIP
<i>PSMD3-f</i>	TTAAGCGCTCGAAAGAAAGC	ChIP
<i>PSMD3-r</i>	ATAAATCCACAGCCGAGGTG	ChIP
<i>PSMF1-f</i>	TGGGACTACTTCCGGCTTC	ChIP
<i>PSMF1-r</i>	CCGGGGTAGCTATAACTCTGC	ChIP
<i>RB1CC1-f</i>	CTTCCGGACCTGCGTAGAC	ChIP
<i>RB1CC1-r</i>	TGTCGACTCCGTCTCTTCCT	ChIP
<i>RBBP15-f</i>	GCCTTCTAAGGCCGAAAGTC	ChIP
<i>RBBP15-r</i>	CAGCAACTCGAGGTTTCATCC	ChIP
<i>RBM42-f</i>	GAGGGTCCCTCCAAACTTTCC	ChIP
<i>RBM42-r</i>	CAAGAACCCTGGGCTATGAG	ChIP
<i>RPL11-f</i>	GCACTACCCACAAGGGAGAA	ChIP
<i>RPL11-r</i>	GGCTCTTTTCCCAGGCTAAC	ChIP
<i>RPL12-f</i>	CCCCTTTCGGAATCTCTAGC	ChIP
<i>RPL12-r</i>	GCGGACAAGCCAGATATAGG	ChIP
<i>RPL13A-f</i>	ACGCTTCGACCAATGAAAAC	ChIP
<i>RPL13A-r</i>	TGTCGCAGGGTTTCTTATCC	ChIP

Anhang

<i>RPL22-f</i>	CTCCTTCCTTCCCCAGAAAC	ChIP
<i>RPL22-r</i>	GAGCGATTGGTTTTTTCCTGA	ChIP
<i>RPL23-f</i>	CTTCAGGCCGGAGAGAGAG	ChIP
<i>RPL23-r</i>	GGATCCTGCCATCTCAACTC	ChIP
<i>RPL3-f</i>	CGCGGCTTTTCACTAAGTTT	ChIP
<i>RPL3-r</i>	GCTCTTCCGCTCCTAGCTTT	ChIP
<i>RPL37-f</i>	TGACTGCTAACGTGCGAAAC	ChIP
<i>RPL37-r</i>	GTCAAGAGGAGGATGCGGTA	ChIP
<i>RPL5-f</i>	GAAAGCGAAAGGCTCCAGTA	ChIP
<i>RPL5-r</i>	ATGCTCGGGGTATCTCACAG	ChIP
<i>RPS11-f</i>	GAAGGCTGAACGAACAGAGC	ChIP
<i>RPS11-r</i>	GGGAAGTGCTAGACGGTGTC	ChIP
<i>RPS14-f</i>	GAGGTATACTTCCGGGACACG	ChIP
<i>RPS14-r</i>	GACTCCACACCGGAAAGAGA	ChIP
<i>RPS17-f</i>	CTGTGTGGCTCCCGAGTAG	ChIP
<i>RPS17-r</i>	CGAGCCAAAACACCTACCAT	ChIP
<i>RPS21-f</i>	GCACGCCCGTATCTCTAGC	ChIP
<i>RPS21-r</i>	CGAATAGCAGCTGGGAGAAG	ChIP
<i>RPS26-f</i>	GAACGCATTTCCACCCTAGA	ChIP
<i>RPS26-r</i>	TTAGGAGACGGGCTTCAAGA	ChIP
<i>RPS9-f</i>	CGCCGGCGTTACTATAAGAG	ChIP
<i>RPS9-r</i>	CATCCAACCCAAACCCTAGA	ChIP
<i>RSRC1-f</i>	TCCAGTCCCACCTTTATTGC	ChIP
<i>RSRC1-r</i>	TTTGTTTGGCGTTTGTTTTG	ChIP
<i>RTKN-f</i>	CTGCCTTCCTCTCTCCCTCT	ChIP
<i>RTKN-r</i>	ATGGGACAAAGGGGTGAGTT	ChIP
<i>S100PBP-f</i>	CGATGAGACGGGAAAAGGT	ChIP
<i>S100PBP-r</i>	GCCTCTAGGAGGGTTGTGC	ChIP
<i>SEN5-f</i>	TGCTTCACTAGCTGGGTGTG	ChIP
<i>SEN5-r</i>	GGGTGGTCTTGATCTCCTGA	ChIP
<i>SETDB1-f</i>	CCCGAGTAGCTGGGACTACA	ChIP
<i>SETDB1-r</i>	ACGAGGTCAGGAGATGGAGA	ChIP
<i>SIP1-f</i>	CCCTAAACTGCCACTTGCTC	ChIP
<i>SIP1-r</i>	TTTTCAAACCAGCCAGTTCC	ChIP
<i>SIVA-f</i>	GAGACTGCCACTGCACTCAG	ChIP
<i>SIVA-r</i>	CCCCTTCTTCTAGCTCTT	ChIP
<i>SNRPB2-f</i>	AAAGGTGGAAGGCACTGTTG	ChIP
<i>SNRPB2-r</i>	GCTGCGAGGGAATAGTGAAG	ChIP
<i>SNTG2-f</i>	GCCGCACTGGAATTTATCC	ChIP
<i>SNTG2-r</i>	AGGAGCCTCACAGATGCAGT	ChIP
<i>SOD1-f</i>	GTAAGTCCCGGGATTGAGGT	ChIP
<i>SOD1-r</i>	CCCAAGATGGATGCTTTTGT	ChIP
<i>SUCLG1-f</i>	AATTTGTTTCAGGCGACTGCT	ChIP

Anhang

<i>SUCLG1-r</i>	GGAGACCATGGTAGCGATGT	ChIP
<i>TAF13-f</i>	ACCTAGCCCCGTGATTTTCCTT	ChIP
<i>TAF13-r</i>	CGGAATGCGACAGTCTCTA	ChIP
<i>TMBIM4-f</i>	CGACTTCAACTATGGCAGCA	ChIP
<i>TMBIM4-r</i>	GCACTGGAGAGGGGACAAC	ChIP
<i>TMEM167B-f</i>	CGGCTAGCCACTCCTGATAG	ChIP
<i>TMEM167B-r</i>	GGTGACTGGAAGAAGCCGTA	ChIP
<i>TNIK-f</i>	AAAACGCAGCCTGAAAGAAA	ChIP
<i>TNIK-r</i>	AACTCCAAAGCCAACACTGG	ChIP
<i>TOR1A-f</i>	GAGTTTCCGGAAGCAAAACA	ChIP
<i>TOR1A-r</i>	GCGGAGGCCATCTTTCTT	ChIP
<i>TPK1-f</i>	AGCAAATGGCCTCCTTGTTA	ChIP
<i>TPK1-r</i>	TCAAGTCTCCAAGGCTTCGT	ChIP
<i>trna119Ala-f</i>	ACTTG TGCCAGGGGATGTAG	ChIP
<i>trna119Ala-r</i>	AATCTACGTGATCGCCTTGG	ChIP
<i>trna158Ile-f</i>	TTGGAGCTGCTTTTTTGGTTT	ChIP
<i>trna158Ile-r</i>	AGATTCAACGACCCCAAGC	ChIP
<i>trna7Leu-f</i>	ATGTAGCATAAGCGCGTCAG	ChIP
<i>trna7Leu-r</i>	ACTGTCAGGAGTGGGATTCG	ChIP
<i>TSHZ1-f</i>	GTCTGAAAGCTCTGCGATCC	ChIP
<i>TSHZ1-r</i>	CTCCTGGGAGAGAGGGAGAT	ChIP
<i>U2SURP-f</i>	TTCACTGAGATCCGCTCTTTC	ChIP
<i>U2SURP-r</i>	GTTTTGTCCGCCATCTTGAG	ChIP
<i>UBE4A-f</i>	ATTTTCTGCTGGTCCAATGC	ChIP
<i>UBE4A-r</i>	GCACTGTAAGGGGTTCCAA	ChIP
<i>UBR5-f</i>	GAATCCGAGCGAAAGAACAC	ChIP
<i>UBR5-r</i>	GAGTGAGTGTTCCGGAGAGC	ChIP
<i>UHMK1-f</i>	CCAAACCTAGCGCGTCTAAT	ChIP
<i>UHMK1-r</i>	GCCTATCATAACAGGCCGAAG	ChIP
<i>UNC45B-f</i>	CAGCTCCTCACTCCAACCTC	ChIP
<i>UNC45B-r</i>	TGGTGGTGCACGTCTGTAAT	ChIP
<i>USP43-f</i>	CCCTTCCTTGCCGATTAAA	ChIP
<i>USP43-r</i>	CGAGTGGTTGTGGTTTGCT	ChIP
<i>VAMP4-f</i>	CAGTGGTTGTTCCCTCCCTA	ChIP
<i>VAMP4-r</i>	CCGAGCCCTATTACACTAAA	ChIP
<i>VHL-f</i>	GAGTACGGCCCTGAAGAAGA	ChIP
<i>VHL-r</i>	GCGATTGCAGAAGATGACCT	ChIP
<i>VPS72-f</i>	AAGGGAGATCGCTGGGTACT	ChIP
<i>VPS72-r</i>	TCCCACCCTCTAAACCCTCT	ChIP
<i>VRK2-f</i>	AGGCCCTCCTAACTGGAGTC	ChIP
<i>VRK2-r</i>	CGAGCTTCCAATGGCTAGT	ChIP
<i>YWHAH-f</i>	TTCTCCACCATCTCTGC	ChIP
<i>YWHAH-r</i>	CGGCCCTAACGGTCTATTTT	ChIP

Anhang

ZNHIT3-f	AACCTGGGACGCAGCTAATA	ChIP
ZNHIT3-r	TGGACTGATCCTGCTCACTG	ChIP
Myc-f	CACCAGCAGCGACTCTGA	qRT-PCR
Myc-r	GATCCAGACTCTGACCTTTTGC	qRT-PCR
Miz1-f	TGAAGATCCACATCGCTGACG	qRT-PCR
Miz1-r	GGTCTGCAAACCTGTCGCTG	qRT-PCR
b2MG-f	GTGCTCGCGCTACTCTCTC	qRT-PCR
b2MG-r	GTCAACTTCAATGTCTGGAT	qRT-PCR
RSRC1wt-f	GTCCATCGATGCACTCGATATCTCGGCTGAAGCTGCCT GGCGCTAGAACCAGGAAGGCGC	EMSA
RSRC1wt-r	GCGCCTTCCTGGTTCTAGCGCCAGGCAGCTTCAGCCGA GATATCGAGTGCATCGATGGAC	EMSA
RSRC1mut1-f	GTCCATCGATGCACGAGATATCTCGGCTGAAGCTGCCT GGCGCTAGAACCAGGAAGGCGC	EMSA
RSRC1mut1-r	GCGCCTTCCTGGTTCTAGCGCCAGGCAGCTTCAGCCGA GATATCTCGTGCATCGATGGAC	EMSA
RSRC1mut2-f	GTCCATCGATGCACGAGATATCGATGAGGAAGCTGCCT GGCGCTAGAACCAGGAAGGCGC	EMSA
RSRC1mut2-r	GCGCCTTCCTGGTTCTAGCGCCAGGCAGCTTCCTCATC GATATCTCGTGCATCGATGGAC	EMSA
RSRC1mut3-f	GTCCATCGATGCACTCGATATATCGGCTGAAGCTGCCT GGCGCTAGAACCAGGAAGGCGC	EMSA
RSRC1mut3-r	GCGCCTTCCTGGTTCTAGCGCCAGGCAGCTTCAGCCGA TATATCGAGTGCATCGATGGAC	EMSA
UBAP2-f	GGCTTGCCCTGAGTGGTTGGACCACATCACGTGATGAG CACAGGGCGGCCACAGGGGAGT	EMSA
UBAP2-r	ACTCCCCTGTGGCCGCCCTGTGCTCATCACGTGATGTG GTCCAACCACTCAGGGCAAGCC	EMSA
SNX18-f	GGGCTCGGCGGCTCGGCCATCGCTTGCTCTCGCCTGGC AAGGGGCTCTCGGCCGTGGATTAGCGCAGCTGGAGACG TGGGA	EMSA
SNX18-r	TCCCACGTCTCCAGCTGCGCTAATCCACGGCCGAGAGC CCCTTGCCAGGCGAGAGCAAGCGATGGCCGAGCCGCCG AGCCC	EMSA
PLA2G15-f	AGCCCCGAGCCAGGCGATACCTCGATCCATCGATGCGC TCGGCGCTCAGCGTGGTCCAGGA	EMSA
PLA2G15-r	TCCTGGACCACGCTGAGCGCCGAGCGCATCGATGGATC GAGGTATCGCCTGGCTCCGGGCT	EMSA
ZNHIT3-f	ACCTGGGACGCAGCTAATAGATGCGCATCGAGTGTATC GACGCTCTAAGTACGAGGGCTGGAACAGT	EMSA
ZNHIT3-r	ACTGTTCCAGCCCTCGTACTTAGAGCGTCGATACACTC GATGCGCATCTATTAGCTGCGTCCCAGGT	EMSA
TSHZ1-f	GCAGGAAAAGCAGCTCGATGTGTCTGTCTATCAGTTGA GACTGTCTGAAAGCTCTGCGATCCGAATGTGTGTATA TTTCACT	EMSA
TSHZ1-r	AGTGAAATATAACACACATTCGGATCGCAGAGCTTTCA GACAGTCTCAACTGATAGACAGACACATCGAGCTGCTT TTCTGC	EMSA
shMiz1	CCGGCCAGTTGGCCAATCATATTCTCGAGAATATGATT GGCCAACCTGGTTTTTTG	Depletion mittels shRNA
shMyc	CCGGCCAAGGTAGTTATCCTTAAACTCGAGTTTAAGGA TAACTACCTTGGTTTTTTG	Depletion mittels shRNA

8.3. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Martin Eilers für die Bereitstellung dieses interessanten Projekts, die kontinuierliche Unterstützung, sowie für hilfreiche Ratschläge und angeregte Diskussionen.

Außerdem danke ich den Mitgliedern meines Thesis Committees, Prof. Dr. Stefan Gaubatz und Prof. Dr. Dr. Manfred Scharl, für die Betreuung meiner Arbeit.

Insbesondere gilt mein Dank Elmar, der fortwährend Hilfestellung gab und entscheidend zum Gelingen des Projekts beitrug.

Bei allen Labormitarbeitern möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Für unzählige Gele und die eine oder andere RNA-Präparation möchte ich mich herzlich bei der guten Seele des Labors, Renate, bedanken.

Vielen Dank an Steffi P, Christina, Anne D, Steffi H und Lisa für die schöne Atmosphäre, viele Ratschläge und Unterstützung auch in schwierigen Zeiten. Ich danke Euch für die 5 tollen Jahre im Labor und unzählige, schöne Abende (ich werde Euch auch mal wieder bekochen;)).

Danke an die Korrekturleser (nicht nur dieser Arbeit) Steffi H, Steffi P, Christina, Lisa und Elmar.

Zum Schluß gilt mein besonderer Dank meiner Familie, die immer für mich da ist.

8.4. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation

„DNA-Bindung von Myc und Miz1 und transkriptionelle Regulation ihrer Zielgene“

eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Würzburg, 1. Juli 2014

Ort, Datum

Unterschrift

