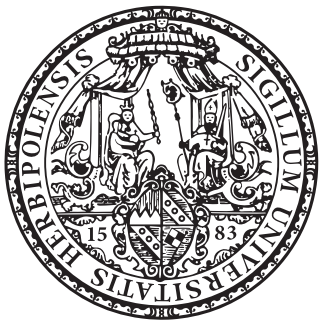
Aus dem Theodor-Boveri-Institut am Biozentrum

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



Die Rolle der HectH9/Mcl1-Interaktion in der Myc-induzierten Apoptose

und

Auswirkungen der Myc V394D-Mutation auf die von c-Myc gesteuerten Tumorgenese in einem transgenen Mausmodell

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)

der Fakultät Biologie der Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Judith Müller

aus Aschaffenburg

Würzburg am Main, Oktober 2010

Eingereicht am: 27. Oktober 2010

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Eilers

2. Gutachter: Prof. Dr. Manfred Schartl

Tag des Promotionskolloquiums: 16. Februar 2011

Doktorurkunde ausgehändigt am:

1 Einleitung 1

1.1 Das Proto-Onkogen Myc 1

1.1.1 Die Myc-Familie 1

1.1.2 Myc in humanen Krankheitsbildern 1

1.2 Myc als Transkriptionsfaktor 3

1.2.1 Struktur von Myc 3

1.2.2 Myc als Aktivator der Transkription 4

1.2.3 Myc als Repressor der Transkription 7

1.2.4 Die Regulation von Micro-RNAs durch Myc 7

1.3 Transkriptionsunabhängige Funktionen von Myc 8

1.4 Regulierung von Myc 9

1.5 Biologische Funktionen von Myc 11

1.5.1 Myc und Zellzyklus 11

1.5.2 Myc und genetische Instabilität 12

1.5.3 Myc und Apoptose 14

1.6 Der Transkriptionsfaktor Miz1 als Partnerprotein für Myc-vermittelte Repression 17

1.7 Myc im murinen Mausmodell 19

1.8 Das MycV394D Mausmodell 20

1.9 Zielsetzung der Arbeit 22

2 Materialien 23

2.1 Stämme und Zelllinien 23

2.1.1 Bakterienstämme 23

2.1.2 Säugerzelllinien 23

2.1.3 Primäre Zellen 23

2.1.4 Transgene Mausstämme 23

2.2 Nukleinsäuren 24

2.2.1 Primer 24

2.2.2 DNA-Oligonukleotide 26

2.2.3 Plasmide 27

2.3 Antikörper 29

2.3.1 Primärantikörper 29

2.3.2 Sekundärantikörper 30

2.4 Chemikalien 31
2.5 Medien 31
2.5.1 Medien für die Bakterienkultivierung 31
2.5.2 Medien und Chemikalien für die Zellkultur 32
2.6 Puffer und Lösungen 32
2.7 Gebrauchsmaterialien 37
2.8 Enzyme und Reaktionskits 37
2.9 Geräte, Membranen und Filme 37

3 Methoden 39
3.1 Molekularbiologische Methoden 39
3.1.1 Transformation von Bakterien 39
3.1.2 Anzucht von Bakterienkulturen zur Amplifikation von Plasmid-DNA 39
3.1.3 Isolierung von bakterieller extrachromosomaler DNA 40
3.1.4 Isolierung von genomischer DNA 40
3.1.5 Native Gelelektrophorese von DNA 41
3.1.6 Elution von DNA aus der Gelmatrix 41
3.1.7 Hydrolyse von Plasmid-DNA 41
3.1.8 Hybridisierung von einzelsträngiger DNA 42
3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten 42
3.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 43
3.1.11 Isolierung von RNA 44
3.1.12 cDNA-Synthese 44
3.1.13 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren 45
3.1.14 Quantitative reverse Transkriptase PCR (real time PCR) 45
3.2 Zellbiologische Methoden 46
3.2.1 Kultivierung von Zellen 46
3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen 46
3.2.3 Transfektion von Zellen 47
3.2.4 stabile retrovirale Infektion von Zellen 48
3.2.5 Kultivierung von Zellen zur Induktion von Apoptose 49
3.2.6 Bestrahlung von Zellen mit UVB/UVC 49
3.2.7 Propidiumiodid-Durchflusszytometrie 50
3.2.8 Kaspase-3 Durchflusszytometrie 50
3.2.9 Giemsa-Färbung von Zellen 50

3.2.10 Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase Färbung von Suspensionszellen 51
3.3 Proteinbiochemische Methoden 51
3.3.1 Ernte von Zellen 51
3.3.2 Herstellungen von Proteinlysaten 51
3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford 52
3.3.4 Protein-Komplex-Immunopräzipitation (Co-IP) 53
3.3.5 *In vivo* Ubiquitinierungs-Untersuchung 53
3.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 54
3.3.7 Immunoblot 54
3.3.8 Detektion von Proteinen durch Immunofärbung und ECL-Detektion 55
3.3.9 Strippen von PVDF Membranen 55
3.3.10 indirekte Immunfluoreszenz 56
3.3.11 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) 56
3.4 Tierexperimentelle Methoden 58
3.4.1 Zucht von Mäusen 58
3.4.2 Intraperitoriale Injektion von Mäusen 58
3.4.3 Organentnahme aus Mäusen 58
3.4.4 Isolierung von T-Lymphocyten 58
3.4.5 Herstellung von Paraffinschnitten 58
3.4.6 Herstellung von Kryoschnitten 59
3.5 Immunhistochemische Methoden 59
3.5.1 Entparaffinisierung von Geweben 59
3.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Paraffinschnitten 59
3.5.3 Antikörperspezifische Färbung von Paraffinschnitten 60
3.5.4 TUNEL-Färbung von Paraffinschnitten 61
4 Ergebnisse 62
4.1 Die Rolle der HectH9/Mcl1-Interaktion bei der Vermittlung der Myc-induzierten Apoptose 62
4.1.1 Charakterisierung eines geeigneten Zellsystems 62
4.1.2 Merkmale der Myc-induzierten Apoptose 64
4.1.3 Die Mcl1 Abnahme ist unabhängig von der Transkription und deutet auf proteasomale Degradation hin. 65
4.1.4 Die Depletion von *HECTH9* vermindert die Myc-induzierte Apoptose 68
4.1.5 HectH9 ubiquitiniert Mcl1 *in vivo* 71

4.1.6 HectH9 und Mcl1 interagieren sowohl exogen als auch endogen ... 72
4.1.7 Lysin-freies Mcl1 wird stabilisiert und schützt vor Myc-induzierter Apoptose ... 73
4.1.8 Die Aktivierung von Myc induziert die DNA-Schadensantwort ... 75
4.1.9 Das Maß der Ubiquitinierung von Mcl1 nimmt nach DNA-Schaden zu ... 76
4.1.10 Die Behandlung mit Koffein vermindert das Level von Myc-induzierter Apoptose ... 77
4.1.11 Durch Anwendung von Koffein wird die Ubiquitinierung von Mcl1 gehemmt und dessen Proteinlevel stabilisiert ... 78
4.2 Auswirkungen der MycV394D-Mutation auf die von c-Myc gesteuerte Tumorgenese in einem transgenen Mausmodell ... 80
4.2.1 MycV394D Tumore zeigen eine Verringerung der Proliferationsrate durch eine Akkumulation in der G2/M Phase ... 80
4.2.2 MycV394D-exprimierende Tumore weisen eine erhöhten Prozentsatz seneszenter Zellen auf ... 82
4.2.3 In MycV394D-exprimierenden Tumoren sind die Mengen von p15Ink4b erhöht ... 84
4.2.4 Miz1-Proteinmengen sind im Vergleich zu Myc-Mengen nicht verändert ... 85
4.2.5 *Cdkn2b* ist ein direktes Zielgen von Myc ... 86
4.2.6 Myc vermittelt einen direkten Einfluss auf die Repression der Zellzyklusinhibitoren ... 87
4.2.7 Der TGFbeta-Signalweg ist in Myc-induzierten Tumoren aktiv ... 89
4.2.8 Myc-wt und MycV394D-exprimierende Zellen unterscheiden sich in ihrer Antwort auf TGFβ ... 92
4.2.9 Die Expression des TβR-II-ED vermindert die Induktion der Seneszenz *in vivo* ... 94
4.2.10 *Tgfβ2/3* sind direkte Zielgene von Myc ... 96
5 Diskussion ... 98
5.1 Die Relevanz der Interaktion von HectH9 und Mcl1 in der Myc-induzierten Apoptose ... 98
5.1.1 Mcl1 spielt ein Rolle in der Myc-induzierten Apoptose ... 98
5.1.2 Die E3 Ligase HectH9 katalysiert die für die Auslösung der Apoptose essentielle Degradation von Mcl1 ... 100
5.1.3 Durch Myc vermittelte Apoptose basiert auf der Induktion von DNA-Schaden ... 102
5.1.4 Inhibition von HectH9 als möglichen Therapieansatz ... 106
5.1.5 Therapeutische Inhibition von Mcl1 ... 108

5.1.6 Möglichkeiten zur Inhibition der Myc-Aktivität 109
5.1.7 Kooperation von Myc und Mcl1 110
5.2 Die Interaktion von Myc und Miz1 unterdrückt die TGFβ-induzierte Seneszenz *in vivo* 112
5.2.1 MycV394D-exprimierende Tumore erfüllen drei Merkmalen der onkogenen Seneszenz vollständig 112
5.2.2 Die Seneszenz im T-Zell-Lymphom wird durch das Zytokin TGFβ vermittelt 116
5.2.3 Erhöhte Mengen an *p15Ink4b*-Transkripten resultieren aus einem Defekt der MycV394D Mutante, den Genlokus zu reprimieren 118
5.2.4 Sowohl Myc-wt als auch die Interaktions-defiziente Mutante MycV394D besetzen die Promotoren ihrer Zielgene 119
5.2.5 Die Expression des Tumorsuppressors p15Ink4b ist nicht ausschlaggebend, um die Tumorgenese zu verzögern 120
5.2.6 Cdks und Myc kooperieren bei der Ausbildung von Seneszenz 122
5.2.7 Myc und TGFβ üben einen antagonistischen Effekt aufeinander aus 124
5.3 Der Vergleich von Apoptose und Seneszenz als Tumor-suppressive Mechanismen 127
6 Zusammenfassung 128
7 Summary 129
8 Literaturverzeichnis 130
9 Anhang 151
9.1 Abkürzungsverzeichnis 151
9.2 Lebenslauf 154
9.3 Publikationen 155
9.4 Danksagung 156
9.5 Ehrenwörtliche Erklärung 157

1 Einleitung

1.1 Das Proto-Onkogen Myc

1.1.1 Die Myc-Familie

Das Proto-Onkogen *C-MYC* wurde 1979 im humanen Genom als Homolog des viralen v-gag-myc (v-myc) identifiziert. Der Genlokus kodiert für einen Transkriptionsfaktor der die typische Struktur eines basischen Helix-Loop-Helix-Leucin-Zippers (bHLH-LZ) aufweist. Myc beeinflusst sowohl die Aktivierung als auch die Repression von Zielgenen. Die Deletion von *Myc* (*knockout*) im Mausmodell ist embryonal letal am Tag 10,5. Pathologische Abnormalitäten sind eine reduzierte Körpergröße sowie kardiale und neuronale Defekte des Embryos. Die Fertilität heterozygoter Weibchen ist vermindert (Davis *et al.*, 1993).

Der Myc-Proteinfamilie angehörig sind neben c-Myc noch N- und L-Myc. Bislang konnten nur in Rattenzellen B- und S-Myc identifiziert werden (DePinho *et al.*, 1987; Ingvarsson *et al.*, 1988; Sugiyama *et al.*, 1989). Diese Proteine teilen untereinander viele strukturelle Eigenschaften, wie den Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper, den Carboxy-Terminus und die hochkonservierten Bereiche der Myc-Boxen. Die Myc-Proteine sind auch in ihrer Funktion über unterschiedliche Spezies hinweg konserviert, so kann das *Myc*-Gen aus Drosophila (*dmyc*) Myc in Säugetierzellen substituieren (Schreiber-Agus *et al.*, 1997).

Die kodierende Sequenz von *C-MYC* besteht aus 3 Exons, von denen ausgehend zwei unterschiedliche Produkte translatiert werden (Hann und Eisenman, 1984). Das Protein p64 wird von dem initialen AUG des ORF der Exons 2 und 3 ausgehend translatiert und wird im Vergleich zu p67, das von einem CUG innerhalb des Exons 1 entstammt, bevorzugt exprimiert. Eine verkürzte Form von c-Myc, c-Myc-S, resultiert aus alternativer Translation, ausgehend von einem abwärts gelegenen AUG-Kodon. Dieses Protein ist um die ersten 100 Aminosäuren verkürzt. C-Myc-S kann als dominant negativer Regulator auf die von c-Myc vermittelte Transkription wirken (Cowling und Cole, 2008; Spotts *et al.*, 1997). Kürzlich wurde eine post-translational durch Calpain gespaltene Form von c-Myc, Myc-*nick*, identifiziert, die vorwiegend in quieszenten Zellen auftritt und einen stimulierenden Einfluss auf die Differenzierung hat (Conacci-Sorrell *et al.*, 2010).

1.1.2 Myc in humanen Krankheitsbildern

In nicht transformierten Zellen ist die Expression von Myc streng reguliert und sowohl die

Halbwertszeit der mRNA mit 10 Minuten (Dani *et al.*, 1984), als auch die des Proteins mit 25 Minuten kurz (Hann und Eisenman, 1984). In quieszenten Zellen wird Myc nur schwach exprimiert, wobei sich die Expression nach mitogener Stimulation der Zellen rasch erhöht und die Zellen zur Zellteilung angetrieben werden. Ist die Regulation des Proteins gestört führt dies zu erhöhten Proteinmengen und Myc kann als treibende Kraft die Transformation und Tumorprogression induzieren und dadurch die Ausprägung unterschiedlicher Krebsformen begünstigen.

Die Mitglieder der Myc-Familie sind an der Ausprägung einer Vielzahl hämatopoetischer und solider Tumore beteiligt. Eine erhöhte Expression von Myc liegt in 70% aller humanen Krebsformen vor (Dang *et al.*, 2006). Onkogene Veränderungen der Myc-Proteinmengen werden durch Punktmutation, Genamplifikation, Translokalisation, Überexpression, verstärkte Translation und erhöhte Proteinstabilität begünstigt (Vita und Henriksson, 2006).

Die Insertionsmutagenese resultiert aus einer Insertion von viraler DNA in unmittelbarer Nähe zu einem zellulären Proto-Onkogen. *MYC* wurde als erstes Gen beschrieben, dessen Expression durch die Nähe zu einem retroviralen Promoter verstärkt werden kann (Payne *et al.*, 1982).

In 100% aller humanen Burkitt Lymphomen liegt eine chromosomale Translokation zwischen dem *MYC*-Genlokus und der Kontrollregion der leichten oder schweren Kette der Immunglobuline vor, die zu einer verstärkten Expression des Proteins führt (Dalla-Favera *et al.*, 1982; Taub *et al.*, 1982). Gerichtete somatische Mutationen, vorzugsweise an Threonin58 (Thr58) und Serin62 (Ser62), den Phosphorylierungsstellen zur Regulierung der Myc Stabilität (siehe Abschnitt 1.4), kooperieren mit genetischen Rearrangements und tragen zu einer weiteren Erhöhung der Myc-Proteinmenge bei. Als sekundäre Mutation wurde am Beispiel des Burkitt Lymphoms in 30% aller Fälle eine Mutation von p53 entdeckt, die zum Funktionsverlust des Tumorsuppressors führt (Gaidano *et al.*, 1991). Bei der Entstehung eines non-Burkitt-Lymphoms tritt die Translokation von *MYC* häufig gemeinsam mit einer initialen Translokation von *BCL2* auf (Johnson *et al.*, 2009). Auch das Auftreten weiterer hämatopoetischer Tumoren resultiert aus einer Aktivierung von Myc in Folge von chromosomaler Translokation (Gauwerky *et al.*, 1989).

Im Gegensatz zu hämatopoetischen Neoplasien sind in soliden Tumoren meist Gen-Amplifikationen ursächlich an der Überexpression von Myc beteiligt. Insbesondere im Neuroblastom konnten multiple Kopien des Genlokus von *MYCN*, der für das Onkogen N-Myc kodiert, nachgewiesen werden (Kohl *et al.*, 1983; Schwab *et al.*, 1983). Diese Eigenschaft korreliert mit einer schlechten Prognose für den Krankheitsverlauf des Patienten (Brodeur *et al.*,

1984). Weitere bösartige Tumore, in denen speziell eine Amplifikation von *MYCN* vorliegt sind Retinoblastome, Medulloblastome und Glioblastome.

Alle drei Mitglieder aus der Myc-Familie können die Ausprägung des kleinzelligen Lungenkarzinom (SCLC; *small cell lung cancer*) und auch des Glioblastoms verursachen. In 30% aller metastasierender Melanome wurden vermehrte Kopien des *C-MYC*-Lokus gefunden (Treszl *et al.*, 2004). Eine Überexpression von c-Myc und L-Myc wurde mit einer Frequenz von 40% im Ovarialkarzinom beobachtet. Im Gebärmutterhalskrebs liegt Myc in 29% der Krankheitsfälle in erhöhter Expression vor und kooperiert mit einer Infektion des humanen Papillomavirus (HPV) (Abba *et al.*, 2004).

Während der Entwicklung eines Kolonkarzinoms steigt die *MYC*-mRNA auf das 5 bis 40-fache an (Erisman *et al.*, 1985). In diesem Krankheitsbild kollaboriert die Überexpression von Myc mit einem Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*; LOH) des *APC*-(*adenomatous polyposis-coli*) Genlokus (Erisman *et al.*, 1989).

1.2 Myc als Transkriptionsfaktor

1.2.1 Struktur von Myc

Die Proteinstruktur von Myc gliedert sich in eine Transaktivierungsdomäne am N-Terminus und eine C-terminale DNA-Bindedomäne. Die DNA-Bindedomäne ist essentiell für die Genregulation. Im C-Terminus befindet sich das bHLH-LZ Motiv (Murre *et al.*, 1989), das die Bindung zu dem Partnerprotein Max (*Myc-associated factor-X*) vermittelt, woraufhin die Bindung an die DNA ermöglicht wird (Hurlin und Huang, 2006). Die Myc-Max-Heterodimere binden mit einer hohen Affinität an konservierte Sequenzen (CACGTG), so genannte kanonische E-Box-Sequenzen (Blackwell *et al.*, 1990).

In der Transaktivierungsdomäne befinden sich zwei der vier hochkonservierten Sequenzen, die so genannten Myc-Boxen.

Die am stärksten konservierte Sequenz befindet sich innerhalb der Myc-BoxII und wird zur Bindung von Kofaktoren, zur Transaktivierung und Transrepression von Zielgenen und zur Ausprägung Myc-vermittelter biologischer Funktionen, wie Transformation und Apoptose benötigt (Cowling und Cole, 2006).

Innerhalb der Myc-BoxI liegen die zur Regulation des Proteins wichtigen

Phosphorylierungsstellen, welche in vielen Lymphomen mutiert sind ("*hotspot*"-Mutationen) (Bhatia *et al.*, 1993; Lutterbach und Hann, 1994) und dadurch zu einer Stabilisierung des Proteins führen.

Myc-BoxIIIa spielt bei der Induktion von Apoptose, Transformation und Tumorgenese eine Rolle (Herbst *et al.*, 2005). Mit Myc-BoxIIIb wurde eine weitere hochkonservierte Sequenz beschrieben, deren Funktion bislang ungeklärt ist (Meyer und Penn, 2008).

In Vertebraten findet man darüber hinaus Myc-BoxIV. Dieser Bereich ist nötig für die Apoptoseinduktion, die Transaktivierung und steuert das Auftreten eines G2-Arrests (Cowling *et al.*, 2006). Obwohl diese Sequenz außerhalb der DNA-Bindedomäne liegt, schwächt ihre Deletion die DNA-Bindung und vermindert dementsprechend die Genaktivierung.

Myc besitzt eine NLS (*nuclear localisation sequence*) innerhalb von Myc-BoxIV, welche verantwortlich für die subzelluläre Lokalisation des Proteins innerhalb des Nukleus ist (Hann und Eisenman, 1984).

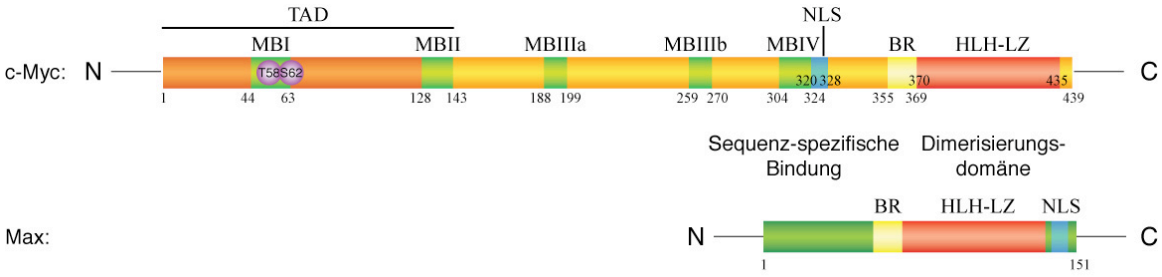


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Proteine c-Myc und Max
(A): Das 64kD schwere Protein c-Myc besitzt 5 konservierte Myc-Box-Bereiche (MB), sowie ein Kernlokalisierungssignal (NLS). Die basische Region (BR) und der Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper (HLH-LZ) befinden sich im C-Terminus des Proteins. N-terminal liegt die Transaktivierungsdomäne (Andersson *et al.*). (B): Max besitzt ein Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper (HLH-LZ) zur Interaktion mit Myc und eine basische Region. Die NLS liegt im C-Terminus des Proteins.

1.2.2 Myc als Aktivator der Transkription

Etwa 15% aller Gene werden durch Myc reguliert (Fernandez *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003). Innerhalb des humanen Genoms konnten 50.000 Bindestellen für Myc identifiziert werden (Susanne Walz, persönliche Mitteilung).

Im Heterodimer mit Max (siehe Abb. 1.1) bindet Myc an hochkonservierte E-Boxen und vermittelt eine Aktivierung der Transkription von Zielgenen. Neben der Initiation wird Myc auch bei der Elongation der Transkription eine Funktion zugeschrieben.

Nach der Bindung des Myc/Max-Komplexes an den Promotor eines Zielgens wird TRRAP (*transformation/transcription domain-associated protein*) an die DNA rekrutiert (McMahon *et al.*, 2000). TRRAP ist Teil eines makromolekularen Komplexes, der Histonacetyltransferasen (HATs) enthält. Zu diesen gehören GCN5, PCAF und TIP60 (Amati *et al.*, 2001; Sterner und Berger, 2000). Neben GCN5 (McMahon *et al.*, 2000), konnte auch für TIP60 eine direkte Interaktion mit Myc und eine dadurch vermittelte Rekrutierung zum Chromatin gezeigt werden (Frank *et al.*, 2003). Die Bindung der p300-CBP (*cAMP-response-element-binding protein*) Acetyltransferase an die Promotoren ist ebenfalls ein von Myc-abhängiger Prozess (Vervoorts *et al.*, 2003). Durch die Acetylierung der Histone H3 und H4 bildet sich eine Plattform, wodurch die Anlagerung des ATP-abhängigen *Chromatin-remodelling*-Komplexes als auch die Anlagerung von Proteinen die an acetylierte Histone (SWI/SNF) binden, erleichtert wird (Cheng *et al.*, 1999). Nach der Anlagerung der basalen Transkriptionsfaktoren bindet die RNA-PolymeraseII (RNAPII) an den Promotor des Zielgens und wird an der C-terminalen Domäne (CTD) durch TFIIH (*transcription factor IIH*) phosphoryliert (Dahmus, 1996) um den Präinitiations-Komplex zu bilden. Sobald die RNAPII die Promotorregion verlässt und auf der RNA voranschreitet, beginnt der Prozess der Elongation der mRNA. Die Formation des Präinitiations-Komplexes sowie die Rekrutierung der RNAPII geschehen unabhängig von Myc. Für eine vollständige Aktivierung von Myc Zielgenen ist die durch Myc beeinflusste Anlagerung von TFIIH, P-TEFb und dem Mediator-Komplex nötig (Bouchard *et al.*, 2004).

Neben der wichtigen Rolle von Myc in der Initiation der Transkription wird ebenfalls eine Funktion in der Elongation diskutiert, indem Myc die Phosphorylierung der RNAPII vermittelt und dadurch als Triebkraft der Polymerase dient (Eberhardy und Farnham, 2001).

Im Laufe der Transkription kann die RNAPII etwa 20-40 Basen nach dem Startpunkt pausieren. Allgemein wird angenommen, dass 21% der transkribierenden Komplexe am Chromatin anhalten (Law *et al.*, 1998). Zur effektiven Elongation wird die andauernde Phosphorylierung der CTD der RNAPII benötigt (Price, 2008; Saunders *et al.*, 2006). Kinasen, durch die CTD phosphoryliert wird sind Zyklin H/Cdk7, Zyklin C/Cdk8 und Zyklin T/Cdk9. Zyklin H und Cdk7 sind Teil des basalen Transkriptionsfaktors TFIIH, der die Elongation stimulieren kann (Dvir *et al.*, 1997). Zyklin C und Cdk8 gehören dem Mediator-Komplex an. Cdk9 und Zyklin T, die aus den Zyklinen T1, T2a und T2b bestehen, sind Teil des P-TEFb (*positive transcription elongation factor b*). Es konnte zunächst für einzelne Promotoren gezeigt werden, dass Myc die Elongation der Transkription stimulieren kann, indem es durch direkte Bindung an P-TEFb (Eberhardy und Farnham, 2002) die Phosphorylierung der CTD begünstigt. Dieser durch Myc regulierte

Mechanismus konnte zuletzt genomweit für Myc-Zielgene nachgewiesen werden (Rahl *et al.*, 2010).

Einen weiteren Beitrag zur Genaktivierung leistet Myc indem es die Methylierung der 5´-Kappe der unreifen mRNA begünstigt (Cowling und Cole, 2007a) (siehe Abschnitt 1.3). Dieser Prozess, wie auch Stimulierung der Elongation, ist unabhängig von einer direkten Interaktion von Myc mit der DNA.

Neben der Aktivierung der RNAPII-abhängigen Gene verstärkt Myc sowohl Gene die von RNAPIII transkribiert werden (tRNA und 5sRNA) (Gomez-Roman *et al.*, 2003; Steiger *et al.*, 2008) als auch RNAPI vermittelte Transkription (ribosomale RNA) (Arabi *et al.*, 2005; Grandori *et al.*, 2005; Grewal *et al.*, 2005). Daher wird postuliert, dass Myc zur Stimulation des Zellwachstums beiträgt indem es der Zelle Komponenten, die zur Translation benötigt werden, in ausreichender Menge zur Verfügung stellt.

In Drosophila konnte gezeigt werden, dass die Bindung an Max keinesfalls essenziell für die Funktionalität von Myc ist. Auch in der Abwesenheit von Max ist Myc noch in der Lage, Zielgene zu aktivieren und biologische Antworten auf entsprechende Stimuli auszulösen (Steiger *et al.*, 2008).

Die Sequenzerkennung der E-Box durch Myc ist ein wichtiger Vorgang zur Anlagerung an die DNA aber möglicherweise erst in zweiter Instanz entscheidend (Guccione *et al.*, 2006). Die Erkennung von Myc-Bindestellen ist in höherem Maß von epigenetischen Faktoren abhängig. Epigenetische Inseln, die durch spezielle Histonmodifikationen (Acetylierung und Methylierung der Histone) gekennzeichnet sind dienen als essenzielle Signale für Myc, an Zielpromotoren zu binden. Dies hat zur Folge dass E-Box Sequenzen, die in heterochromatischen Bereichen liegen, von Myc nicht erkannt werden können.

Die von Myc vermittelte Transkription kann durch die Expression von Mitgliedern der Mxd-Familie (früher Mad) und Mnt antagonisiert werden. Mxd-Proteine sind Myc-verwandte bHLH-LZ, die ebenfalls mit Max heterodimerisieren können und an E-Boxen binden. Deren Bindung an Promotoren vermittelt eine Repression von Genen, da reprimierende Komplexe, wie der mSin3-Korepressor-Komplex (Ayer *et al.*, 1995), an die Promotoren rekrutiert werden. Dadurch kompetitieren Mxd-Proteine mit Myc um die Bindung an Max, sowie um die Bindung an die spezifischen genomischen Sequenzen (Grinberg *et al.*, 2004). Während die Depletion von Mad1, Mxi1 (Mad2) und Mad3 nur geringe Effekte auf die Proliferation und Transformationskapazität

der Zelle ausübt (Foley *et al.*, 1998; Queva *et al.*, 2001; Schreiber-Agus *et al.*, 1998), ähnelt die verminderte Expression von Mnt, einem weiteren Max-bindenden Protein, dem Phänotyp einer Myc-Überexpression (Nilsson *et al.*, 2004). Myc-Max-Komplexe kommen in sich teilenden Zellen vor, wohingegen man Mxd-Max-Komplexe vorwiegend in differenzierten Zellen findet (Ayer und Eisenman, 1993).

1.2.3 Myc als Repressor der Transkription

Erste Vermutungen, dass Myc auch als transkriptioneller Repressor tätig sein kann, resultierten aus der Beobachtung, dass die Transkription von endogenem Myc durch transloziertes Myc oder exogenes Myc gehemmt werden kann (Cleveland *et al.*, 1988). Durch Struktur-Funktions-Analysen konnte gezeigt werden, dass die Regionen innerhalb des Myc-Proteins, die zur Transformation benötigt werden auch die Auto-Regulation beeinflussen (Penn *et al.*, 1990). Verglichen mit der Aktivierung von Zielgenen durch Myc ist über die Funktion von Myc als Repressor bisher weniger bekannt.

Die Repression durch Myc ist unabhängig von der Bindung an E-Boxen benötigt aber Initiator Elemente (INR) in der basalen Promoter-Region (Li *et al.*, 1994). Für diese Repression wird die Funktionalität der Myc-BoxII und der bHLH-LZ Region benötigt. Das aktuelle Modell postuliert einen heterodimeren Komplex aus Myc und Max, dessen Interaktion mit der DNA über transkriptionelle Aktivatoren wie Nfy (*nuclear factor Y*), Sp1 oder Miz1 (*Myc-interacting zinc finger1*) vermittelt wird (Kleine-Kohlbrecher *et al.*, 2006). Miz1 bindet als Transkriptionsaktivator direkt an die DNA. Sobald Myc an den entsprechenden Promotor rekrutiert wird, bindet es Miz1 direkt und reprimiert die Transkription der Zielgene, möglicherweise indem es mit Miz1 um die Bindung der Acetyltransferase p300 konkurriert (Staller *et al.*, 2001). Gut beschriebene Zielgene des Myc/Max/Miz1-Komplexes sind *CDKN1A* (kodiert für p21Cip1) (van de Wetering *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003), *CDKN2B* (kodiert für p15Ink4b) (Seoane *et al.*, 2001; Staller *et al.*, 2001) und der Myc-Antagonist *MAD4* (Kime und Wright, 2003). Die durch Myc reprimierten Genprodukte vermitteln Zellzyklusarrest, Zelladhäsion und Zell-Zell-Kommunikation (Gebhardt *et al.*, 2006; van de Wetering *et al.*, 2002).

1.2.4 Die Regulation von Micro-RNAs durch Myc

Neben der Transkription kodierender mRNA-Moleküle reguliert Myc die Transkription von micro-RNAs (miRNAs). Dies sind 21bp bis 23bp lange Nukleotide, die nicht für ein Protein kodieren. MiRNAs regulieren Ziel-mRNAs indem sie sowohl deren Stabilität als auch die Effizienz der Translation beeinflussen. Die Expression von miRNAs hat einen Einfluss auf

Zellproliferation und kann Apoptose auslösen. Die Expression von miRNAs ist in vielen humanen Krankheitsbildern dereguliert und in Tumoren häufig reduziert (Chang *et al.*, 2008). O´Donell und Kollegen konnten zeigen, dass Myc ein Cluster von 6 miRNAs durch eine direkte Interaktion mit E-Boxen aktiviert (O'Donnell *et al.*, 2005). Als Konsequenz dieser Regulierung des mir-17 Clusters wird die Translation der für *E2f1* codierenden mRNA negativ beeinflusst. Dementsprechend wird die Expression von E2F1 durch Myc zum einen auf transkriptioneller Ebene positiv beeinflusst und zum anderen auf Ebene der Translation durch miRNAs negativ reguliert. Im Gegensatz dazu reprimiert Myc die Expression von miRNAs, die das Wachstum von Lymphomzellen negativ beeinflussen und beschleunigt auf diese Weise die Lymphogenese (Chang *et al.*, 2008).

1.3 Transkriptionsunabhängige Funktionen von Myc

Die Annahme, dass Myc auch Funktionen ausüben kann, die unabhängig von seiner Funktion als Transkriptionsfaktor sind, resultierte aus drei Beobachtungen:

1) Eine Deletionsmutante von Myc, der die DNA-Bindedomäne fehlt, verliert zwar ihre Affinität zur DNA, konnte aber dennoch die Proliferationsrate in Myc-defizienten Fibroblasten erhöhen (Cowling und Cole, 2007b).

2) Die Zellproliferation wurde durch Expresion von Myc-Mutanten gesteigert, die mit Max nicht dimerisieren können (Cowling und Cole, 2007b).

3) In Max-defizienten PC12 Zellen war Myc in der Lage Differenzierung zu inhibieren (Maruyama *et al.*, 1987).

Von der Transkription unabhängige Mechanismen, die durch Myc beeinflusst werden beschränken sich soweit bekannt auf eine Beeinflussung der Translation sowie eine direkte Beteiligung an der Replikation.

Während der Translation addiert das *capping enzyme* (CE) eine invertierte Guanylylgruppe an das 5´Ende der mRNA und erhöht damit die Stabilität der mRNA (Schwer *et al.*, 1998). Um die Bindung der Translationsfaktoren zu begünstigen muss die RNA am 5'-Ende durch eine RNA Methyltransferase (RNMT) methyliert werden. Sowohl CE als auch RNMT binden an die CTD der RNAPII, wenn diese zuvor von TFIIH am Ser5 phosphoryliert wurde. Myc erhöht die Translations-Rate, indem die Methylierung des 5'-Guanidins der mRNA (5´Kappe) durch die Rekrutierung von TFIIH begünstigt wird (Bentley, 2005; Shatkin, 1976). Dieser Mechanismus ist unabhängig von einer direkten Bindung von Myc an die DNA, benötigt aber die Transaktivierungsdomäne von Myc.

Myc kann die Progression des Zellzyklus direkt beeinflussen, unabhängig von der Induktion von S-Phase Genen. Im Laufe der Initiation der Replikation wird ein Präreplikativer-Komplex aus einer Vielzahl von regulatorischen Proteinen, wie MCMs, ORC2, Cdc6 und Cdt1, gebildet. Myc interagiert direkt mit Proteinen dieses Komplexes und kolokalisiert mit Replikationsstartpunkten (Dominguez-Sola *et al.*, 2007). Die Depletion von Myc aus Xenopus-Extrakten (somit unabhängig von Transkription und Proteinbiosythese) vermindert die DNA Synthese und dieser Effekt kann durch Transfektion von rekombinantem Myc revertiert werden.

Die Stimulation der DNA Replikation durch Myc erhöht den genomischen Stress innerhalb der Zellen und löst die DNA-Schadensantwort aus, was schließlich in genomischer Instabilität resultiert (Vafa *et al.*, 2002, vgl. Abschnitt 1.5.2).

1.4 Regulierung von Myc

Als Proto-Onkogen unterliegt Myc in nicht-transformierten Zellen einer strengen posttranskriptionellen Kontrolle. Ist die Regulation des Proteinumsatzes gestört, wird Myc stabilisiert und es folgt daraus ein potentiell Tumor-stimulierender Mechanismus, der in einer Vielzahl von humanen Krankheitsbildern beschrieben ist.

Als Antwort auf mitogene Stimuli wird Myc N-terminal am Ser62 phosphoryliert und dadurch zunächst die Proteinstabilität erhöht. *In vitro* kann diese Phosphorylierung von Erk durchgeführt werden (Sears *et al.*, 2000). Kürzlich konnte *in vivo* Cdk2 als Kinase für die Phosphorylierung am Ser62 identifiziert werden (Hydbing *et al.*, 2010). Durch diese initiale Modifikation wird die von Gsk3β (*Glycogen synthase kinase* 3) vermittelte Phosphorylierung an Thr58 ermöglicht, welches ebenfalls im N-Terminus von Myc liegt. Reguliert wird die Aktivität von Gsk3β durch die Phosphatidylinositol3-Kinase (PI3K), die ihrerseits durch Insulin, Wachstumsfaktoren und Onkogene wie Ras stimuliert wird. Der Abbau von Myc kann eingeleitet werden, sobald die Prolyl-Isomerase Pin1 eine Konformationsänderung an dem doppelt-phosphorylierten Protein durchgeführt hat. Daraufhin wird die Phosphorylierung an Ser62 durch die Phosphatase PP2A hydrolysiert (Yeh *et al.*, 2004) und die daraus resultierende Einfach-Phosphorylierung von Thr58 dient als Signal für Fbw7 an Myc zu binden. Fbw7 gehört zu der Klasse der F-Box-Proteine und agiert im SCF-Komplex als Adaptorprotein. Fbw7 bindet seine Substrate direkt und leitet sie den RING-Finger-Proteine zu (Jackson *et al.*, 2000). Vermittelt durch die Bindung von Fbw7 wird Myc polyubiquitiniert und im Proteasom abgebaut (Welcker und Clurman, 2008). Die Deubiquitinase (DUB) Usp28 antagonisiert den Abbau von Myc, indem es das Protein durch Bindung an Fbw7 im Nukleus festhält (Popov *et al.*, 2007).

Im diesem beschriebenen Signalweg zum Abbau von Myc gibt es einige Komponenten deren Mutation zu einer Stabilisierung des Proteins führen.

Das Threonin an Position 58 gilt als sogenannter "*hotspot*" für Mutationen. Ist diese Aminosäure mutiert, fehlt das Signal zum proteasomalen Abbau und das Protein Myc wird stabilisiert. Eine Akkumulation der Mutation dieser einzelnen Aminosäure konnte vorwiegend in Lymphomen nachgewiesen werden (Bahram *et al.*, 2000). Weiterhin sind Mutationen in Fbw7 (O'Neil und Look, 2007) sowie die verstärkte Expression von Usp28 (Popov *et al.*, 2007) in Tumoren beschrieben. In Konsequenz beider Ereignisse wird Myc stabilisiert.

Für die zelluläre Regulierung von Myc sind, neben den bisher genannten, weitere Mechanismen bekannt:

Eine weitere Ubiquitinligase, die für Myc identifiziert wurde, ist der SCF(Skp2)-Ubiquitinligase-Komplex (Kim *et al.*, 2003; von der Lehr *et al.*, 2003). Skp2 interagiert mit zwei Bereichen des Myc-Proteins, den Aminosäuren 129 bis 147 innerhalb der Myc-BoxII und den Aminosäuren 379 bis 418 (Kim *et al.*, 2003). Der Skp2-vermittelte Abbau ist unabhängig vom Phosphorylierungsstatus von Myc (Amati, 2004). Durch die Ubiquitinierung wird zunächst die transkriptionelle Aktivität von Myc verstärkt (von der Lehr *et al.*, 2003) und das Protein anschließend zur proteasomalen Degradation geleitet (Muratani und Tansey, 2003). Dadurch wird die Beseitigung von aktivem Myc sichergestellt. Skp2 liegt in Tumoren hoch exprimiert vor (Bashir *et al.*, 2004), ubiquitiniert allerdings auch den Zellzyklus negativ beeinflussende Regulatoren wie p21Cip1, p27Kip1 und p57Kip2.

Die Ubiquitinierung von Proteinen hat Einfluss auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse. Die Ubiquitinreste einer Ubiquitinkette sind generell an den Lysinen48 oder 63 verknüpft, daneben sind auch Ubiquitinierung an Lysin11 und Lysin4 bekannt. Die Lysin48 (K48)-Verknüpfung hat im Allgemeinen eine proteasomale Degradation zur Folge wohingegen eine Lysin63 (K63)-Verknüpfung die Affinität von Proteinen zueinander modifiziert (Deng *et al.*, 2000). Ein hoher Gehalt an Lysinen ist ein Merkmal vieler Transkriptionsfaktoren, um diese durch Ubiquitinierung regulieren zu können (Freiman und Tjian, 2003).

HectH9 (Huwe1, Mule, ArfBP1) ist eine E3-Ubiquitinligase, die beide Arten der Ubiquitinierung an Myc anbringen kann. HectH9 gehört der Familie der HECT-Domänen enthaltenden Proteine an. An c-Myc katalysiert HectH9 *in vitro* und *in vivo* eine K63-verlinkte Polyubiquitinierung, welche durch Miz1 inhibiert wird. Die Modifikation an c-Myc verstärkt die Transkription einiger

Zielgene durch Rekrutierung des Kofaktors p300 und hat eine erhöhte Proliferationsrate zur Folge. Die Herunterregulation von HectH9 durch siRNA-Technik arretiert Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus (Adhikary *et al.*, 2005). In ES-Zellen und neuronalen Stammzellen hingegen wird N-Myc von HectH9 durch K48-Verknüpfungen ubiquitiniert und daraufhin im Proteasom abgebaut. Dieser Prozess resultiert in einem Proliferationsarrest, der letztlich zur neuronalen Differenzierung der Zellen führt (Zhao *et al.*, 2008). Der Abbau von N-Myc ist ein essentieller Prozess, der die Proliferation limitiert und Neurogenese auslöst. Die Deletion von HectH9 im zentralen Nervensystem ist embryonal letal (Zhao *et al.*, 2008).

1.5 Biologische Funktionen von Myc

Die große Bedeutung von Myc wird dadurch ersichtlich, dass es eine Vielzahl biologischer Prozesse beeinflusst. Neben den im folgenden Abschnitt genauer behandelten Funktionen bei der Proliferation, der Apoptose und der Induktion genetischer Instabilität übt Myc einen stimulierenden Effekt auf Transformation, Ribosomenbiogenese und Proteinbiosynthese, Metabolismus und Angiogenese aus. Prozesse wie Differenzierung und die Fähigkeit zur Zelladhäsion werden durch eine gesteigterte Expression von Myc gehemmt.

1.5.1 Myc und Zellzyklus

Der Zellzyklus ist ein komplex und präzise regulierter Prozess, der es einer Zelle erlaubt sich zu verdoppeln und zwei identische Tochterzellen hervorzubringen. Die Übergänge von der G0/G1-Phase zur S-Phase und von G2- zur M-Phase sind genauestens kontrolliert und ermöglichen der Zelle bei inadäquater Zellteilung bzw. fehlerhafter Replikation den Zellzyklus anzuhalten und in der entsprechenden Phase zu arretieren um aufgetretene Mängel zu beseitigen. Der Übergang der G1- zur S-Phase wird durch Zykline und Zyklin-abhängige Kinasen (Cdks) reguliert. Die Gruppe der D-Zykline wird als Antwort auf mitogene Stimuli zeitlich vor den anderen Zyklinen synthetisiert (Weinberg, 2007). D-Typ Zykline binden und aktivieren Cdk4 und Cdk6. Die Komplexe aus Zyklin D/Cdk4 und Zyklin D/Cdk6 phosphorylieren das Retinoblastoma-Protein (pRb) und die damit verwandten *pocket*-Proteine p107 und p130. Die Hyperphosphorylierung an pRb leitet die Freisetzung von E2F-Proteinen aus dem pRb/E2F-Komplex ein. Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie aktivieren die Transkription von Zyklin E, Zyklin A und weiteren Genen, die spezifisch für den Eintritt in die S-Phase sind (Weinberg, 2007). Die Aktivität der Cdks wird durch die Bindung an Zykline, sowie durch Zyklin-abhängige-Kinase-Inhibitoren (CKIs) (Ha *et al.*) reguliert. Letztere lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Der Gruppe der Cip/Kips gehören p21Cip1, p27Kip1 und p57Kip2 an. Diese Inhibitoren wirken auf

Komplexe aus Zyklinen und Cdks und hemmen alle diese Komplexe. Die zweite Gruppe der Inhibitoren besteht aus der Ink-Gruppe, der p15Ink4b, p16Ink4a, p18Ink4c und p19Ink4d angehören. Diese Proteine wirken nur auf Cdk4 und Cdk6, unabhängig von deren Bindung an Zykline (Weinberg, 2007). Die Inhibition durch CKIs löst Zellzyklusarrest als Antwort auf DNA-Schaden, Seneszenz und TGFbeta (*transforming growth factor β*)-Stimulation aus.

In arretierten Zellen genügt allein die ektopische Expression von Myc, um den Übergang von der G0/G1-Phase zur S-Phase zu induzieren (Eilers *et al.*, 1991; Kaczmarek *et al.*, 1985). Im Vergleich zu Kontrollzellen haben Myc-defiziente Fibroblasten eine verlängerte Verdopplungszeit was mit verminderter Aktivität von Cdk2/4/6 korreliert (Mateyak *et al.*, 1997; Mateyak *et al.*, 1999). In Zellen mit erhöhter Myc-Expression hingegen ist die G1-Phase verkürzt und die S-Phase beschleunigt (Robinson *et al.*, 2009). Diese Punkte sprechen für eine essenzielle Beteiligung von Myc an der Regulierung des Zellzyklus, hauptsächlich durch transkriptionelle Stimulation wichtiger Zellzyklusregulatoren.

Myc induziert direkt die Expression von Zyklin D2 und Cdk4. Der Cdk4/D-Komplex führt zur Hyperphosphorylierung von pRb und zur gleichzeitigen Sequestration von p27Kip1 wodurch der Zyklin E/Cdk2-Komplex aktiviert wird. Auch Zyklin E und Cdk2 sind als direkte Zielgene von Myc beschrieben (Leone *et al.*, 1997) und deren Expression erhöht die Hyperphosphorylierung an pRb. Die Expression von Cul1, das dem E3-Ligase-Komplex angehört der den Abbau von p27Kip1 katalysiert, wird ebenfalls transkriptionell von Myc stimuliert. Die Transaktivierung der aktivierenden Mitglieder der E2F-Familie ist ein weiterer Beitrag, durch den Myc die Zellproliferation vorantreiben kann.

Als Repressor reguliert Myc in Assoziation mit Miz1 die Transkription der CKIs *p21Cip1* und *p15Ink4b*, die ihrerseits die Aktivität von Cdk4/6 und Cdk2 inhibieren. Damit antagonisiert Myc die Funktion des Zytokins TGFβ, das durch Hochregulation dieser CKIs zum Zellzyklusarrest führt.

1.5.2 Myc und genetische Instabilität

Myc bewirkt genetische Instabilität durch Induktion reaktiver Oxygenspezies (ROS) (Vafa *et al.*, 2002), Veränderungen der Chromosomenstruktur (Louis *et al.*, 2005; Prochownik und Li, 2007), Induktion der DNA-Schadensantwort (Adachi *et al.*, 2001; Dominguez-Sola *et al.*, 2007; Gorrini *et al.*, 2007; Reimann *et al.*, 2007) und Überwindung des p53-vermittelten Kontrollpunkts (Yin *et al.*, 1999).

In Zellkulturexperimenten mit humanen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung eines an den Östrogenrezeptor fusionierten Myc-Proteins Doppelstrangbrüche induziert. Als Antwort darauf wird das Reparaturprotein Mre11a zu den Brüchen rekrutiert und H2A.X phosphoryliert (Vafa *et al.*, 2002). Gemeinsam mit der Phosphorylierung von p53 am Serin15 weist dies auf eine Beteiligung der Kinasen Atm und Atr als Antwort auf Myc-induzierte DNA Schäden hin. Die Aktivierung von Myc resultiert in einer Akkumulation der Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus, was charakteristisch für das Auftreten von DNA-Schaden vor dem Eintritt in die S-Phase ist (Felsher *et al.*, 2000). Eine Überinterpretation der Zellkulturergebnisse ist bedenklich, da die Zellen aufgrund nicht-physiologischer Sauerstoffpartialdrücke einer weiteren DNA-Schaden-induzierenden Substanz ausgesetzt sind, die möglicherweise mit der Aktivierung von Myc kooperiert.

Auch *in vivo* konnte durch Myc-induzierter DNA-Schaden beobachtet werden. Unter der Kontrolle eines Keratin5-Promotors führt Myc in Keratinozyten zur Aktivierung von Atm mit anschließender Phosphorylierung von H2A.X und p53 am Ser15 (Pusapati *et al.*, 2006). In Lymphozyten konnte eine durch Myc verursachte Aktivierung der DNA-Schadensantwort im Mausmodell beobachtet werden (Reimann *et al.*, 2007). Der Verlust einer Kopie von Tip60, welches ein Koaktivator von Myc und ebenfalls ein Aktivator der Atm Kinase ist, vermindert nicht die Transaktivierungsaktivität von Myc, reduziert allerdings die Myc-abhängige Aktivierung von Atm (Gorrini *et al.*, 2007). Myc-induzierte hämatopoetische Tumore sind genetisch instabil und begünstigen das Auftreten weiterer genetischer Veränderungen, wie zum Beispiel Translokationen (Karlsson *et al.*, 2003b).

Myc beeinflusst die Durchführung der DNA Reparatur negativ, was seinerseits zur Anhäufung weiterer chromosomaler Brüche und Translokationen führt (Karlsson *et al.*, 2003a). Ein von Wade und Wahl beschriebener möglicher Mechanismus dafür ist, dass TopoisomeraseI (Top1), als aktiviertes Zielgen von Myc dazu führt, die gewundene DNA zu relaxieren, wodurch die Replikationsgabel sterisch begünstigt die Möglichkeit hat mit der Replikation fortzufahren (Wade und Wahl, 2006).

Die Akkumulation von DNA-Schaden gilt als Barriere, durch die Tumorgenese limitiert wird. Durch weitere Mutationen im Lauf der malignen Transformation müssen Kontrollpunkte überwunden werden so dass Krebs entstehen kann (Bartkova *et al.*, 2005; Gorgoulis *et al.*, 2005; Pusapati *et al.*, 2006).

1.5.3 Myc und Apoptose

Die Apoptose ist ein zelleigener Schutzmechanismus, der es einem Organismus ermöglicht, abnormale oder beschädigte Zellen zu eliminieren und sich vor der Akkumulation von Mutationen zu bewahren. Der Prozess der Apoptose resultiert in Schrumpfen und Kondensation der Zelle. Der Aufbau des Zytoskeletts wird destabilisiert, die Kernhülle löst sich auf und die DNA wird fragmentiert. Die Zellmembran wird dementsprechend moduliert, so dass apoptotische Zellen erkannt werden können und vom Immunsystem oder Nachbarzellen phagozytiert werden.

Man unterscheidet zwei Signalwege, die zur Apoptose führen können:

Der **intrinsische** Signalweg der Apoptose wird durch unterschiedliche intrazelluläre Signale wie DNA-Schaden, Aktivierung von Onkogenen, Hypoxie oder Entzug von Wachstumsfaktoren ausgelöst. Hierbei spielt der Tumorsuppressor p53 eine tragende Rolle als Sensor nukleärer Signale und Vermittler zum Mitochondrium. Seine Aktivierung entscheidet darüber, ob die Zelle zum Wachstumsstillstand kommt, um den entstandenen Schaden zu reparieren, oder beseitigt wird. Als Transkriptionsfaktor induziert p53 die Transkription proapoptotischer Proteine, wie Bax, Noxa und Puma (Miyashita *et al.*, 1995, Oda *et al.*, 2000, Nakano *et al.*, 2001). Es ist allerdings auch bekannt, dass p53 transkriptionsunabhängig direkt die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran induzieren kann (Mihara *et al.*, 2003).

Die intrazelluläre Weiterleitung apoptotischer Signale wird durch Proteine der Bcl2-Familie am Mitochondrium reguliert (Weinberg, 2007). Das Verhältnis aus antiapoptotischen und proapoptotischen Mitgliedern dieser Familie entscheidet, ob die Apoptose ausgelöst wird. Bax und Bak begünstigen den Austritt von Zytochrom C in das Zytoplasma, indem sie eine Pore in der Mitochondrienmembran bilden, die zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran führt (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) (Weinberg, 2007). Bcl2, Bcl_{XL} und Mcl1 (*myeloid cell leukemia sequence 1*) antagonisieren diese Wirkung, indem sie die proapoptotischen Proteine in einem inaktiven Komplex halten. Zytoplasmatisches Zytochrom C reagiert mit Apaf-1 und bildet das Apoptosom, welches Prokaspase 9 spaltet (Aktivator-Kaspase). Im aktivierten Zustand spaltet Kaspase 9 die nachgeschalteten Prokaspasen 3,6 und 7 (Exekutor-Kaspasen). Deren Aktivierung resultiert in der Proteolyse der sogenannten "Todessubstrate" (*death substrate*) wie Vimentin, Lamin, PARP (*poly(ADP-ribose)polymerase*) und Aktin, woraus morphologische Änderungen apoptotischer Zellen resultieren.

Die Exekutor-Kaspasen werden im **extrinsischen** Signalweg unabhängig vom Mitochondrium durch die Oligomerisierung von Todesrezeptoren nach Bindung ihrer Liganden (z.B. TRAIL)

aktiviert.

Zellulär kann die Aktivierung von Kaspasen durch IAPs (*inhibitor of apoptosis*) durch zwei Mechanismen verhindert werden. Zum einen binden IAPs direkt an Kaspasen und inhibieren dadurch deren auf die Proteolyse folgende Aktivierung. Zum anderen markieren IAPs Kaspasen für den proteasomalen Abbau. Die Aktivität der IAPs wird durch die Wirkung von Smac/DIABOLO antagonisiert (Verhagen und Vaux, 2002).

Die verstärkte Expression von Myc in Zellen erhöht deren Anfälligkeit für apoptotische Stimuli und löst bei Mangel an Wachstumsfaktoren Apoptose aus (Askew *et al.*, 1991; Evan *et al.*, 1992; Shi *et al.*, 1992). In c-Myc defizienten B-Lymphozyten wird die Induktion der Apoptose unterdrückt (de Alboran *et al.*, 2004). Durch Apoptose wird die durch Myc vermittelte Hyperproliferation ausbalanciert. Die Induktion der Apoptose durch Myc kann über p53 gesteuert werden oder unabhängig von p53 auftreten.

Die Deregulation von Myc aktiviert p53 (Hermeking und Eick, 1994; Wagner *et al.*, 1994). Primäre Zellen, die defizient für p19Arf und/oder p53 sind, zeigen weniger Anfälligkeit gegenüber Myc-induzierte Apoptose. *In vivo* kooperiert die Überexpression von c-Myc im B-Zellkompartiment mit einem Verlust von p53 oder p19Arf und beschleunigt dadurch die Lymphogenese (Eischen *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 1995; Schmitt *et al.*, 1999). Myc reguliert die Expression von p19Arf (Bouchard *et al.*, 2007). Hohe Proteinkonzentrationen von p19Arf führen zur Inaktivierung der E3-Ligase Mdm2 (Hdm2 im Mensch) woraufhin p53 stabilisiert wird. P53 aktiviert die Transkription seiner Zielgene Bax (*BCL2-associated X protein*), Puma (*p53 up-regulated modulator of apoptosis*) und Noxa, die der Gruppe der antiapoptotischen Bcl2-Proteine angehören (Zindy *et al.*, 1998). Die Expression des p53-Zielgens *CDKN1A* wird direkt durch Myc reprimiert und begünstigt dadurch die p53-vermittelte Apoptose im Gegensatz zum Zellzyklusarrest (Herold *et al.*, 2002). Die Arf-Mdm2-p53-Achse wird auch von anderen Onkogenen zur Einleitung von Apoptose genutzt z.B. von E2F1 und Ras.

Dass Myc Apoptose auch unabhängig von p53 induziert, konnte in p53-/- und p19Arf-/- Mausembryofibroblasten (MEFs, *mouse embryonic fibroblasts*) und in hämatopoetischen Zellen gezeigt werden (Eischen *et al.*, 1999; Zindy *et al.*, 1998). Auch Rattenzellen, die eine inaktive Mutante von p53 exprimieren, sind Apoptose-sensitiv gegenüber einer gesteigerten Expression von Myc (Sakamuro *et al.*, 1995). Die p53-unabhängige Apoptose führt ebenfalls zur Destabilisierung der Mitochondrien und zur dadurch veranlassten Freisetzung von Zytochrom C und kann über unterschiedliche Effektorproteine ausgelöst werden.

Ebenso unabhängig von p53 ist die durch Myc vermittelte Inhibierung der antiapoptotischen Proteine Bcl2 und Bcl_{XL} in murinen myeloiden Zellen und im Eμ-Myc Mausmodel (Eischen *et al.*, 2001a; Eischen *et al.*, 2001c; Maclean *et al.*, 2003), wodurch die Apoptose verstärkt wird. Im Gegensatz dazu verhindert die Überexpression von Bcl2 die Myc-induzierte Apoptose im Eμ-Myc Mausmodel und beschleunigt dadurch die Lymphogenese (Eischen *et al.*, 2001a). Mit diesen Daten übereinstimmend kooperiert der Verlust der Expression von Bax mit Myc in der Ausbildung des murinen B-Zell-Lymphoms (Eischen *et al.*, 2001b). Apoptose wird ebenfalls in pankreatischen Beta-Zellen von Bax-/- Tieren nicht mehr ausgelöst. Dieser Effekt ist spezifisch für Bax und tritt nicht in Bak-/- Tieren auf (Dansen *et al.*, 2006; Juin *et al.*, 2002). Zwar sind am Bax-Promoter zwei Bindestellen für Myc enthalten, es konnten allerdings keine Myc-abhängigen Änderungen im Bax-Transkriptionslevel beschrieben werden (Eischen *et al.*, 2001b; Mitchell *et al.*, 2000; Soucie *et al.*, 2001). Daher wird eher diskutiert, ob Myc und Bax unabhängig voneinander in ihrer Funktion, Apoptose zu induzieren, kooperieren.

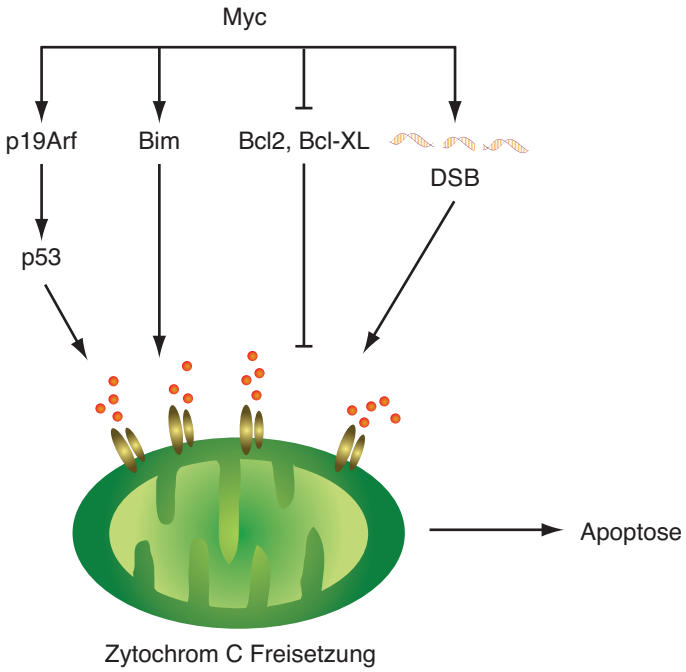


Abbildung 1.2: Die intrinsische Apoptose kann von Myc auf 4 Arten ausgelöst werden.
Myc induziert die Expression von p19Arf, was zu einer Stabilisierung von p53 führt. Eine indirekte Induktion von Bim oder Inhibition von Bcl2 oder Bcl_{XL} verursacht die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Durch Myc-induzierter DNA Schaden löst die DNA-Schadenssignalkaskade aus und resultiert ebenfalls in Apoptose. Die Abbildung wurde modifiziert nach Adhikary und Eilers, 2005.

Weiterhin unabhängig von der Aktivität von p53 ist die indirekte Regulation des proapoptotischen Proteins Bim durch Myc (Egle *et al.*, 2004). Bim erhöht das Apoptoselevel, indem es Bcl2 bindet und dadurch zur Aktivierung von Bax beiträgt. Der Verlust von Bim beschleunigt die

Tumorgenese im Eμ-Myc Mausmodell durch eine Verminderung der Apoptoserate.

Der durch Myc induzierte DNA-Schaden als Auslöser der Apoptose wurde bereits in Abschnitt 1.5.2 behandelt.

Durch Erhöhung der Sensitivität für Todesliganden vermittelt Myc ebenfalls einen Effekt auf den extrinsischen Signalweg der Apoptose. Am Beispiel der durch TRAIL-induzierten Apoptose zeigt sich, dass Myc sowohl transkriptionell Einfluss auf die Expression antiapoptotischer Proteine wie Mcl1 nehmen kann (Ricci *et al.*, 2007), als auch die durch den Liganden verursachte Stimulierung von Kaspasen durch gleichzeitige Kooperation am Mitochondrium verstärken kann (Nieminen *et al.*, 2007).

1.6 Der Transkriptionsfaktor Miz1 als Partnerprotein für Myc-vermittelte Repression

Miz1 ist ein Transkriptionsfaktor, der aus einer C-terminale POZ-BTB (*poxvirus and zincfinger/ Bric-a-brac T ramtrack Broad*)-Domäne und 13 Zinkfingern besteht (Bardwell und Treisman, 1994; Peukert *et al.*, 1997). Die POZ-Domäne ist hochkonserviert und vermittelt über Ausbildung von alpha-Helices die Homo- und Heterodimerisierung mit weiteren POZ-Proteinen. Die Zinkfinger vermitteln die Interaktion mit der DNA. 12 Zinkfinger sind in einem Cluster aufgereiht, der 13te Zinkfinger ist durch eine spacer-Region getrennt. Humanes und murines Miz1 sind zu 92% sequenzhomolog. Der konstitutive *knockout* von Miz1 in der Maus ist auf Grund einer Akkumulation an apoptotischem Gewebe embryonal letal am Tag 7,5 der Gastrulation (Adhikary *et al.*, 2003).

Das nukleoplasmatische Protein Miz1 konnte in einem Hefe-2-Hybridsystem 1997 als Interaktionspartner von Myc identifiziert werden (Schneider *et al.*, 1997). Miz1 agiert als Transkriptionsfaktor und aktiviert den Genlokus von *CDKN1A* (Herold *et al.*, 2002; Seoane *et al.*, 2002), *CDKN2B* (Staller *et al.*, 2001) und *CDKN1C* (kodiert für p57Kip2) (Adhikary *et al.*, 2003), deren Transkription vom Myc/Miz1-Komplex reprimiert wird. Die ektopische Expression von Miz1 resultiert in Wachstumsarrest der Zellen, der durch Myc aufgehoben werden kann. Die Fähigkeit zur Transaktivierung wird durch Assoziation von Miz1 und TopBP1 (*topoisomerase 2 binding protein 1*) negativ reguliert (Herold *et al.*, 2002). In ungestressten Zellen liegen Miz1 und TopBP1 in einem inerten Komplex vor. Nach DNA-Schaden wird Miz1 aus diesem Komplex entlassen und transkriptionell aktiv (Herold *et al.*, 2008). Die dadurch vermittelte Aktivierung des Zellzyklusinhibitors p21Cip1 resultiert in der Inhibition der Komplexe von Zyklin E/Cdk2 und

Zyklin D/Cdk4 und arretiert die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Auch durch TGFβ ausgelöster Zellzyklusarrest beruht auf einer Aktivierung des Zellzyklusinhibitors p15Ink4b (Hannon und Beach, 1994; Seoane *et al.*, 2001). Gleichzeitig mit einer TGFβ-abhängigen Verminderung der Myc-Expression, bindet Miz1 im Komplex mit Smad-Proteinen an den Promoter von *p15Ink4b* und aktiviert diesen (Seoane *et al.*, 2001).

Die intrazelluläre Regulation von Miz1 erfolgt über den PI3K-Signalweg. Die Kinase Akt phosphoryliert Miz1 am Ser428 als Antwort auf zelluläre Stresssignale. Daraufhin bindet 14-3-3 an Miz1 und erschwert dadurch die Interaktion von Miz1 mit der DNA. Durch die Phosphorylierung an Miz1 wird der Wiedereintritt geschädigter Zellen in den Zellzyklus begünstigt (Wanzel *et al.*, 2005). Nukleophosmin ist ein Kofaktor von Miz1, der essenziell für die durch Miz1 vermittelte Transaktivierung und Zellzyklusarrest ist (Wanzel *et al.*, 2008). Das ribosomale Protein L23 rekrutiert den Kofaktor in den Nukleolus und bewirkt dadurch eine negative Regulation der Miz1-abhängigen Transaktivierung. Sowohl Nukleophosmin als auch L23 werden durch Myc reguliert. Dadurch nimmt Myc durch einen Rückkopplungsmechanismus Einfluss auf die Aktivität von Miz1 (Wanzel *et al.*, 2008).

Neben Myc interagiert auch p53 mit Miz1. Diese Bindung vermittelt eine Inhibition der p53-abhängigen Transaktivierung und kann durch kompetitive Bindung von p19Arf an Miz1 antagonisiert werden (Miao *et al.*, 2010). Die Bindung von p19Arf erschwert ebenfalls die Bindung von Miz1 zum Kofaktor Nukleophosmin. Durch p19Arf veranlasst wird Miz1 sumoyliert und geht einen repressiven Komplex mit Myc und trimethyliertem H3K9 (H3K9triMe) ein, der die Transkription von Genen inhibiert, die Zelladhäsion und Signaltransduktion regulieren (Herkert *et al.*, 2010).

Mittels eines Hefe-2-Hybrid-Systems konnte eine Aminosäure innerhalb der Myc-Proteinsequenz ermittelt werden, die zur Wechselwirkung mit Miz1 essenziell ist. Identifiziert wurde ein Valin an Position 394 innerhalb des Helix-Loop-Helix-Motivs. Dieses ist evolutionär hochkonserviert und liegt innerhalb der äußeren Oberfläche von HelixII. Die Mutation von Valin zu Asparaginsäure in der Proteinsequenz resultiert in einem mutierten Protein MycV394D. In ektopischer Expression hat dieses die Fähigkeit zur Interaktion mit Miz1 verloren wohingegen die Wechselwirkung mit Max unbeeinflusst bleibt. Übereinstimmend damit ist die Transaktivierungskapazität der Mutante unverändert, Miz1-Zielgene können allerdings nicht mehr reprimiert werden, was an Reporterkonstrukten gezeigt werden konnte (Herold *et al.*, 2002).

Die durch Myc vermittelten biologische Effekte blieben laut Studie von Herold und Kollegen

durch den Einsatz der MycV394D Mutante im Vergleich zu Myc-wt erhalten (Herold *et al.*, 2002). So konnten sowohl Myc-wt als auch MycV394D den Eintritt in die S- und G1-Phase des Zellzyklus induzieren und gleichermaßen Apoptose unter Niedrigserumbedingungen einleiten. Gegenteilige Beobachtungen sind von Patel und McMahon bekannt. Demnach ist die Bindung von Myc an Miz1 essenziell um Apoptose induzieren zu können (Patel und McMahon, 2006). Ebenso die Fähigkeit von Myc embryonale Rattenfibroblasten zu transformieren hängt nicht von der Interaktion mit Miz1 ab (Patel und Mahon, 2006). Daher ist MycV394D gleichermaßen wie Myc-wt als Onkogen anzusehen.

Ein eindeutiger Unterschied zwischen Myc-wt und MycV394D-exprimierenden Zellen zeigt sich in deren Antwort auf DNA-Schaden. Während Myc-wt bereits 12h nach UVB-Bestrahlung den Wiedereintritt in den Zellzyklus und die Fortsetzung der DNA-Synthese veranlasst, erholen sich MycV394D-exprimierende Zellen erst nach 16h von dem DNA-Schaden. Dies ist damit zu erklären, dass die Induktion des Zellzyklusinhibitors *CDKN1A* im Zuge der DNA-Schadensantwort durch Myc-wt unterdrückt wird, MycV394D gelingt dies durch mangelnde Interaktion mit Miz1 nicht. Vergleichbare Resultate konnten für *CDKN1C* erzielt werden (Herold *et al.*, 2002).

1.7 Myc im murinen Mausmodell

Die ersten Modelle zur Untersuchung der tumorgenen Wirkung von Myc in der Maus wurden in den späten 80er Jahren entwickelt.

Durch Klonierung eines Enhancers der schweren Kette der Immunglobuline in den Regulationsbereich des *myc*-Gens konnte die Expression von Myc verstärkt werden (Eμ-Myc). Daraus resultiert mit 90%iger Wahrscheinlichkeit eine rasche Entwicklung von B-Zell-Lymphomen innerhalb der ersten Lebensmonate der Mäuse (Harris *et al.*, 1988). Morphologisch handelt es sich dabei um lymphoblastische Lymphome, deren Krankheitsbild von lymphoider Leukämie und Granulozytose begleitet wird. Das beschriebene Mausmodell dient sowohl genetisch als auch phänotypisch als Abbild des humanen Burkitt Lymphoms.

Um die Funktion von Myc *in vivo* genauer studieren zu können wurden regulierbare oder induzierbare Mausmodelle entwickelt, von denen sich speziell zwei Modelle bewährt haben.

Zum einen das MycER System, bei dem ein Fusionsprotein aus Myc und dem Östrogenrezeptor erst durch die Zugabe des Östrogenanalogons 4-Tamoxifen (4-OHT) zum Trinkwasser posttranskriptionel aktiviert wird.

Das zweite System wird durch Tetrazyklin (oder dessen Derivate wie Doxyzyklin) gesteuert und kann sowohl in einem *tet-on*- als auch *tet-off*-System angewendet werden.

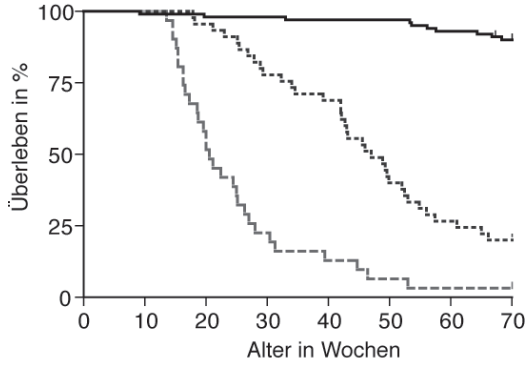
Felsher und Bishop entwickelten ein *tet-off*-System, ausgehend von zwei Konstrukten (Felsher und Bishop, 1999). Der Tetrazyklin-responsive minimale Promoter wurde in die Kontrollregion der humanen *MYC*-cDNA kloniert (*tet-O-Myc*). Das zweite Konstrukt beinhaltet das tTA, dessen Expression durch den Enhancer der schweren Kette der Immunglobuline und den SRα−Promoter (Takebe *et al.*, 1988) reguliert wird (EμSR). Die Kreuzung von Mäusen, die jeweils eines der beiden Konstrukte stabil im Genom integriert haben, resultiert in doppelt-transgenen Tieren, die ohne Behandlung mit Doxyzyklin in 100% der Fälle innerhalb kurzer Zeit (im Alter von 5 Monaten) T-Zell-Lymphome entwickeln. Diese exprimieren die für unreife T-Zellen spezifischen Oberflächenmarker CD8 und CD4 und sind klonalen Ursprungs. Nach Inaktivierung des transgenen *MYC*-Allels durch Zugabe von Doxyzyklin schrumpfen 90% aller Tumore und zu 80% bleibt die Tumorregression über einen Zeitraum von 30 Wochen bestehen. Die Reduktion der Tumorgröße resultiert einerseits aus einer Verminderung der durch Myc-angetriebenen Proliferation. Zum anderen werden Prozesse der Apoptose, Differenzierung und Seneszenz eingeleitet (Felsher und Bishop, 1999; Wu *et al.*, 2007).

1.8 Das MycV394D Mausmodell

Basierend auf Felshers tierexperimentellen Arbeiten sollte ermittelt werden, in wieweit die transreprimierende Funktion von Myc eine Rolle in der Tumorgenese spielt. Dazu wurden tet-O-Myc Gründertiere transgen für Myc-wt oder für MycV394D hergestellt und mindestens 5mal auf den Stammhintergrund FVB/N zurückgekreuzt um einen reinen Stamm zu erhalten (hergestellt von Vincent Beuger und Tarik Möröy). Nach Kreuzung mit EμSR-tTA Mäusen wurden für den Tierversuch doppelt-transgene Gründerlinien ausgewählt, die ähnliche Mengen des transgenen Myc-Proteins exprimierten (wt-1 und wt-2; V394D-1, V394D-2 und V394D-3) und diese Linien expandiert. Die Jungtiere wurden drei Wochen mit Doxyzyklin behandelt, um die Expression von transgenem Myc in deren Entwicklung zu unterdrücken. Nach dem Absetzten des Doxyzyklins wurde der Verlauf der Tumorentwicklung beobachtet und dokumentiert.

Die Überlebenskurve zeigt eine erhöhte Viabilität zugunsten MycV394D-exprimierender Mäuse im Vergleich zu Myc-wt-exprimierenden Mäusen. Die Kombination der beiden Myc-wt-Mauslinien und der 3 MycV394D-Linien in einem Kaplan-Meier-Diagramm verdeutlicht einen signifikanten Unterschied und eine Verdopplung der mittleren Überlebenszeit in MycV394D-exprimierenden Mäusen (Abb. 1.3, Tobias Otto, persönliche Mitteilung). Übereinstimmend mit

Erkenntnissen von Felsher und Bishop exprimieren Tumorzellen beider Gruppen die Oberflächenantigene unreifer T-Lymphozyten. Im Rahmen der Arbeit von Tobias Otto konnten immunhistochemisch keine Unterschiede in der Proliferationsrate, der Apoptose oder Ausprägung von Seneszenz zwischen Myc-wt- und MycV394D-exprimierenden Tumoren festgestellt werden. Die Analyse der Zellzyklusinhibitoren ergab eine signifikante zweifache Erhöhung der *Cdkn2b* mRNA-Menge in MycV394D-exprimierenden Tumoren.



	Anzahl der Tiere	gemittelte Überlebenszeit (in Wochen)
EμSR-tTA x *tetO-Myc* wt	45	20.57
EμSR-tTA x *tetO-Myc*VD	31	47
Kontrolltiere	101	nicht ermittelt

p-Wert (Myc wt zu Myc VD) < 0.0001

Abbildung 1.3: Die mittlere Überlebenszeit von MycV394D-exprimierenden Mäusen ist im Vergleich zu Myc-wt signifikant erhöht.
Transgene Mäuse wurden über eine Zeitspanne von 70 Wochen beobachtet und deren Überleben dokumentiert. Die Expression von transgenem Myc unter der Kontrolle des Tetrazyklin-regulierbaren Promotors resultierte in der Ausprägung von T-Zelllymphomen, die in Kontrolltieren nicht auftraten. Das Kaplan-Meier-Diagramm zeigt den gemittelten Krankheitsverlauf von 2 tet-O-Myc-wt Mauslinien im Vergleich zu 3 tet-O-MycV394D Mauslinien und nicht-transgenen Kontrolltieren. Ein statistischer Vergleich wurde mittels *logrank test* durchgeführt.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Das Onkogen Myc ist ein vielseitiges Protein, das eine große Anzahl zellulärer Prozesse direkt oder indirekt beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit sollten unterschiedliche Funktionen von Myc untersucht werden.

(1) Neben der Stimulation des Zellzyklus assoziiert die Überexpression von Myc mit dem Auftreten von Apoptose. *In vivo* wirkt dies Tumor-suppressiv, da transformierte Gewebe in ihrem Wachstum gehindert werden und einzelne Zellen absterben. Die Stimulation der Myc-induzierten Apoptose zum Beispiel durch Pharmazeutika bietet einen erfolgversprechenden Ansatzpunkt für die Tumortherapie.

In einem Zellkultur-basierten Projekt sollte der Mechanismus der Myc-induzierten Apoptose untersucht werden. Dazu wurde eine Osteosarkomazelllinie gewählt, deren endogene Mengen von Myc verhältnismäßig gering sind. Durch Expression eines an den Östrogenrezeptor fusionierten Myc-Proteins konnte die Menge des Proteins über die physiologischen Level hinaus gezielt induziert werden. Bereits im Vorfeld meiner Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Myc in diesem Zellsystem unter Niedrigserumkonzentration Apoptose einleitet. Unter Verwendung dieses Zellsystems sollte der Verlauf der Apoptose sowie die Korrelation der Expression von Proteinen, die in der Apoptose eine Rolle spielen, dokumentiert werden. Dadurch könnte eventuell belegt werden, wie die von Myc-vermittelten Mechanismen zur Induktion von Proliferation und Apoptose zusammenhängen.

(2) Der Mechanismus der Genaktivierung durch Myc ist ausreichend dokumentiert und nahezu aufgeklärt. Über die Repression von Zielgenen durch Myc ist im Gegensatz dazu wenig bekannt. Um die Relevanz der für Reprimierung wichtigen Interaktion von Myc und Miz1 *in vivo* aufzuklären wurde bereits im Vorfeld meiner Arbeit ein transgenes Mausmodell etabliert, in dem ein Vergleich von wildtyp Myc und MycV394D erfolgte. MycV394D ist eine Punktmutante von Myc, deren Modifikation in einer abgeschwächten Interaktion zu Miz1 resultiert und dadurch die Fähigkeit zur Genrepression unterbunden ist. Die Tumorgenese von MycV394D-exprimierenden Mäusen war im Vergleich zu Myc-wt signifikant verzögert. Die Gründe für das verspätete Auftreten der Tumoren sollten in dieser Arbeit untersucht werden und die Mechanismen, die dazu führen aufgeklärt werden.

2 Materialien

2.1 Stämme und Zelllinien

2.1.1 Bakterienstämme

DH5α	*Escherichia coli*, ϕ80d*lacZ*ΔM15, Δ(*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA*1, *endA*1, *hsdR*17(rk^-, mk^+), *phoA*, *supE*44, λ^-, *thi*-1, *gyrA*96, *relA*
XL1 blue	*Escherichia coli*, *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F´ *proAB lacI*q*ZΔM15* Tn*10* (Tetr)]

2.1.2 Säugerzelllinien

HeLa	humane Zervixkarzinomzelllinie
U2OS	humane Osteosarkomazelllinie
HEK 293T	humane embryonale Nierenzelllinie, transformiert mit adenoviralem E1A, trägt temperatursensitives SV40-*large* Antigen
PHX^{eko}	Derivat der HEK 293 Zelllinie, Verpackungszelllinie zur Herstellung von ekotrophen MoMuLV-Retroviren
PHX^{ampho}	Derivat der HEK 293 Zelllinie, Verpackungszelllinie zur Herstellung von amphotrophen MoMuLV-Retroviren

2.1.3 Primäre Zellen

MEFs	Mausembryofibroblasten, isoliert aus Embryonen E13.5
T-Zellen	murine T-Lymphocyten, isoliert aus T-Zelllymphomen

2.1.4 Transgene Mausstämme

EμSR-tTA	Mauslinie auf FVB/N Stammhintergrund, Tetracyclin-transaktivierendes Protein (tTA) wird unter der Kontrolle des Enhancers der schweren Kette der Immunglobuline (*immunglobulin heavy chain enhancer*) und des SRα-Promoters exprimiert (Felsher und Bishop, 1999). Freundlicherweise von Dean Felsher zur Verfügung gestellt.

tet-O-Myc-wt — von Vincent Beuger und Tarik Möröy hergestellte Mauslinie auf einem C57BL/6-Stammhintergrund. Wurde vor der Verwendung mindestens achtmal auf FVB/N Hintergrund zurückgekreuzt. Exprimiert das Transgen Myc unter der Kontrolle des Tetrazyklin-abhängigen Promoters (tet-O).

tet-O-MycV394D — von Vincent Beuger und Tarik Möröy hergestellte Mauslinie auf einem C57BL/6-Stammhintergrund. Wurde vor der Verwendung mindestens achtmal auf FVB/N Hintergrund zurückgekreuzt. Exprimiert die mutante Form des Transgens Myc (MycV394D) unter der Kontrolle des Tetrazyklin-abhängigen Promoters (tet-O).

p15-KO — von Paul Krimpenfort freundlicherweise zur Verfügung gestellte Mauslinie, deren *Cdkn2b*-Lokus durch eine Hygromycin-Kassette ausgetauscht wurde (Krimpenfort *et al.*, 2007).

2.2 Nukleinsäuren

2.2.1 Primer

Die verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Programms Primer3 Input (version 0.4.0) (frodo.wi.mit.edu) entworfen. Bei der Auswahl für qRT-PCR Primer wurde darauf geachtet, dass deren Sequenz Exon-Intron-Grenzen überschreitet, um eine Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden. Die Synthese der Primer wurde von Metabion, Invitrogen oder Eurofins vorgenommen.

Tab.2.1: Liste der verwendeten Primer.
Die verwendeten Primer wurden nach deren Verwendungszweck (qRT-PCR: quantitative Reverse-Transkriptase PCR; ChIP; gen-PCR: genomische PCR) und deren Spezies aufgeführt. Es wurden jeweils die *forward*(fwd)- und *reverse*(rev)-Sequenzen angegeben.

Bezeichnung	Verwendung	Spezies	Sequenz (5´- 3`)
Actb fwd	qRT-PCR	Maus	CCAACCGTGAAAAGATGACC
Actb-rev	qRT-PCR	Maus	CCAGAGGCATACAGGGACAG
Bax fwd	qRT-PCR	Human	ATGTTTTCTGACGGCAACTTC
Bax rev	qRT-PCR	Human	ATCAGTTCCGGCACCTTG
B2M-fwd	qRT-PCR	Human	TCTCGCTCCGTGGCCT
B2m-rev	qRT-PCR	Human	TCAGTAAGTCAACTTCAATGTCGGAT

HectH9-fwd	qRT-PCR	Human	CCAGAAGTTCTTCTTGAGGGTACT
HectH9-rev	qRT-PCR	Human	GCCTAAACCGGAGGAACC
Il6-fwd	qRT-PCR	Maus	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA
Il6-rev	qRT-PCR	Maus	TCTGCAAGTGCATCATCGTT
Mcl1-fwd	qRT-PCR	Human	TAAGGACAAAACGGGACTGG
Mcl1-rev	qRT-PCR	Human	ACATTCCTGATGCCACCTTC
Mixl-fwd	qRT-PCR	Maus	TCTTCCGACAGACCATGTACC
Mixl-rev	qRT-PCR	Maus	TTCTGGAACCACACCTGGAT
Myc-fwd	qRT-PCR	Maus	TTTGTCTATTTGGGGACAGTGTT
Myc-rev	qRT-PCR	Maus	CATCGTCGTGGCTGTCTG
Noxa-fwd	qRT-PCR	Human	GGAGATGCCTGGGAAGAAG
Noxa-rev	qRT-PCR	Human	CCTGAGTTGAGTAGCACACTCG
Pai1-fwd	qRT-PCR	Maus	CACAAGTCTGATGGCAGCAC
Pai1-rev	qRT-PCR	Maus	ACGTCATACTCGAGCCCATC
Puma-fwd	qRT-PCR	Human	GACCTCAACGCACAGTACGA
Puma-rev	qRT-PCR	Human	GAGATTGTACAGGACCCTCCA
p15Ink4b-fwd	qRT-PCR	Maus	TGCAGATGATCCACAGGCTA
p15Ink4b-rev	qRT-PCR	Maus	GTGAATCCCCACACATGACA
p19Arf-fwd	qRT-PCR	Maus	GTGAACGTTGCCCATCATC
p19Arf-rev	qRT-PCR	Maus	GCTCTGGCTTTCGTGAACAT
p21Cip1-fwd	qRT-PCR	Maus	TCCACAGCGATATCCAGACA
p21Cip1-rev	qRT-PCR	Maus	GGAACACTTTGCTCCTGTG
p57Kip2-fwd	qRT-PCR	Maus	CAGGACGAGAATCAAGAGCA
p57Kip2-rev	qRT-PCR	Maus	GCTTGGCGAAGAAGTCGT
Skil-fwd	qRT-PCR	Maus	CTCCATTCTGCAGAGGAAGC
Skil-rev	qRT-PCR	Maus	CTTCAGTGAGCTCCTTCATCG
S14-fwd	qRT-PCR	Human	GGCAGACCGAGATGAATCCTCA
S14-rev	qRT-PCR	Human	CAGGTCCAGGGGTCTTGGTCC
Tgfbeta1-fwd	qRT-PCR	Maus	TGGAGCAACATGTGGAACTC
Tgfbeta1-rev	qRT-PCR	Maus	CGTCAAAAGACAGCCACTCA
Tgfbeta2-fwd	qRT-PCR	Maus	TGGCTTCACCACAAAGACAG
Tgfbeta2-rev	qRT-PCR	Maus	CTTCGCTTTTATTCGGGATG
Tgfbeta3-fwd	qRT-PCR	Maus	CGCACAGAGCAGAGAATTGA

Tgfbeta3-rev	qRT-PCR	Maus	ATGTAGCGCTGCTTGGCTAT
H2a.z E-Box fwd	ChIP	Maus	GAGATCTGCGGACACGAAA
H2a.z E-box-rev	ChIP	Maus	AGCTTCCCTCCCGGTCTA
p15Ink4b INR-fwd	ChIP	Maus	AACCGGCCACGGTAAGTT
p15Ink4b INR-rev	ChIP	Maus	GGTGGTATCTGAGAGTCGGAAG
p15Ink4b Intron-fwd	ChIP	Maus	GGCTTAAGTGGGTGTCTCCA
p15Ink4b Intron-rev	ChIP	Maus	CATCCCCTCTGGCTCTTACA
p21Cip1-fwd	ChIP	Maus	TCCACAGCGATATCCAGACA
p21Cip1-rev	ChIP	Maus	GGACATCACCAGGATTGGAC
TGFbeta2 INR-fwd	ChIP	Maus	TGTAATCCTAGCGCGTCACTT
TGFbeta2 INR-rev	ChIP	Maus	CCCGGAGCAGAGTTTTATATGT
TGFbeta2 UP-fwd	ChIP	Maus	CCAGACCAGACCGTAACCAT
TGFbeta2 UP-rev	ChIP	Maus	GCAGTGTAGAGCACCCACAA
TGFbeta3 INR-fwd	ChIP	Maus	CGAACCAGAGGACTCACAAAG
TGFbeta3 INR-rev	ChIP	Maus	CTCTCGCTGCACGGTTTTA
TGFbeta3 UP-fwd	ChIP	Maus	AAGGGAGGGGGCAAATTAT
TGFbeta UP-rev	ChIP	Maus	CTTATGGATTCAGAGGCATGG
EμSR-tTA fwd	gen-PCR	synth.	AGGCCTGTACGGAAGTGT
EμSR-tTA rev	gen-PCR	synth.	CTCTGCACCTTGGTGATC
tetO-Myc-wt fwd	gen-PCR	Human	AGCCCCGAGCCCCTGGAG
tetO-Myc-wt rev	gen-PCR	Human	GGCGCTGCGTAGTTGTGCTGATGT
tetO-MYCV394D-fwd	gen-PCR	Human	CTGCTGCCAAGAGGGTCAAG
tetO-MYCV394D.rev	gen-PCR	Human	GTATGCTGTGGC TTTTTTAAGGATAT

2.2.2 DNA-Oligonukleotide

Zur Klonierung von shRNAs wurden DNA-Oligonukleotide verwendet, die im Folgenden aufgeführt sind. Sie wurden mit Hilfe des siDESIGN Center der Firma Dharmacon entworfen und von Metabion synthetisiert.

Tab. 2.2: Liste der verwendeten Oligonukleotide.
Es wurden jeweils die *forward*(fwd)- und *reverse*(rev)-Sequenzen der Oligonukleotide angegeben.

sh-Kontr fwd:	5'-GATCCCC**CATAAGCTGAGATACTTCA**TTCAAG

	AGA**TGAAGTATCTCAGCTTATG**TTTTTGGAAA-3’
sh- Kontr rev:	5’-AGCTTTTCCAAAAA**CATAAGCTGAGATACTT CA**TCTCTTGAA**TGAAGTATCTCAGCTTAT**GGGG-3’
sh-Mcl1 fwd	GATCCCC**AGAAGGTGGCATCAGGAAT**TTCAAG AGA**ATTCCTGATGCCACCTTCT**TTTTTGGAAA
sh-Mcl1 rev	5’AGCTTTTCCAAAAA**AGAAGGTGGCATCAGGAAT** TCTCTTGAA**ATTCCTGATGCCACCTTCT**GGGG-3’
sh-HectH9-II fwd	5’-GATCCCC**GCAGCAGTACAGACTTTAA**TTCAAG AGA**TTAAAGTCTGTACTGCTGC**TTTTTGGAAA-3’
sh-HectH9-II rev	5’AGCTTTTCCAAAAA**GCAGCAGTACAGACTTT AA**TCTCTTGAA**TTAAAGTCTGTACTGCTGC**GGGG-3’

2.2.3 Plasmide

2.2.3.1 Leervektoren

pcDNA3.1: eukaryotisches Expressionsplasmid mit Zytomegalovirus (CMV)-Promoter der Firma Invitrogen

pBABE puro/hygro/blasti: eukaryotische retrovirale Expressionsplasmide mit LTR (*long terminal repeat*)- Promoter und unterschiedlichen Resistenzgenen

pRetroSuper puro/blasti/hygro/GFP: eukaryotische retrovirale Expressionsvektoren für shRNAs mit einem RNA-PolymeraseIII-abhängigem H1-RNA-Promoter und unterschiedlichen Resistenzgenen, bzw. GFP.

pMSCVpuro/blasti/GFP: eukaryotische retrovirale Expressionsvektoren, abgeleitet von *murine stem cell virus,* mit LTR-Promoter und unterschiedlichen Resistenzgenen oder GFP. Eignet sich insbesondere für schwer zu infizierbare Zellen.

pRRLTomate/GFP	Vektor für lentiviralen Gentransfer, Regulation des Transkripts ausgehend von Enhancer und Promoter des *rous sarcoma virus* in Kombination mit den LTRs des HIV1.

2.2.3.2 Expressionsvektoren**:**

pBABE-H2B-GFP:	pBABE-Expressionsvektor, dessen Resistenzgen durch die für das Fusionsprotein aus H2B und GFP kodierende Sequenz ausgetauscht wurde. Das Plasmid wurde zur Kontrolle der Effizienz von Transfektionen und Infektionen verwendet.
pBABE-mcl1-wt:	pBABE-Vektor zur Expression von humanem Mcl1
pBABE-mcl1-mut:	pBABE-Vektor zur Expression von Lysin-freiem Mcl1
pcDNA-mcl1-wt:	pcDNA-Vektor zur Expression von humanem Mcl1 (Zhong *et al.*, 2005)
pcDNA-mcl1-mut:	pcDNA-Vektor zur Expression von Lysin-freiem Mcl1 (Zhong *et al.*, 2005)
pcDNA-His-Ubiquitin:	pcDNA zur Expression von humanem, Histidin-markiertem Ubiquitin
pMSCV-Myc-wt:	pMSCV zur Expression von humanem Myc
pMSCV-MycV394D:	pMSCV zur Expression von humanem Myc mit V394D-Mutation
pMSCV TβR-II-ED:	pMSCV zur Expression der Ektodomäne des humanen TGFβ-Rezeptors II (freundlicherweise bereitgestellt von Clemens Schmitt)
psPAX2	Verpackungsvektor für lentiviralen Gentransfer
pMD2.G	eukaryotisches Expressionsplasmid, kodiert für die lentivirale Hülle

2.3 Antikörper

2.3.1 Primärantikörper

Tab.2.3 : Liste der verwendeten Primärantikörper.
Die Antikörper wurden alphabetisch nach dem erkannten Protein aufgeführt. Weitere Angaben beziehen sich auf die Spezifität, den Verwendungszweck (WB: Immunoblot; IF: Immunfluoresezenz; IP: Immunpräzipitation; IHC: Immunhistochemie; ChIP: Chromatinimmunopräzipitation), den Antikörpertyp und den Hersteller.

Protein	Spezifität	Applikation	Antikörpertyp	Bezugsquelle
Atm-(pSer1981)	Maus, Human	WB, IF	mouse IgG1	Chemicon (#MAB3806)
Arf-Bp1	Maus, Human	WB	rabbit polyklonal	Proscience (#4213)
Bak (Ab-2)	Human	IF, WB	mouse monoklonal	Calbiochem (#AM04)
Bax	Human	WB	rabbit	BD (#554104)
Bcl2 (DC21)	Human	WB	rabbit	Santa Cruz (sc#783)
Bim	Human	WB	rabbit polyklonal	Stressgen (#AAP-330)
BrdU	synth.	IHC	rat	AbD Serotec (#OBT0030CX)
Kaspase3 (8G10)	Human	WB	rabbit monoklonal	Cell Signaling (#9665)
cdk1/cdc2	Maus, Human	WB	rabbit	bereitgestellt von Stefan Gaubatz
cdk1/cdc2	Maus	IHC	rabbit	bereitgestellt von Philip Kaldis
Cdk2	Maus, Human	WB	rabbit	Santa Cruz (#sc-163)
Chk1-(pSer345)	Maus, Human	WB	rabbit	Cell Signaling (#2348)
c-Myc (9E10)	Human	WB	mouse IgG1	Evan *et al.*, 1985
c-Myc (N-262)	Maus, Human	WB, IP	rabbit	Santa Cruz (#sc-764)
HectH9	Human	WB, IP	mouse	beritgestellt von Kristian Helin
Hemaglutinin (HA)	Tag	WB, IP, IF	mouse monoklonal	Covance (#16B12)
Histon H2A.X-(pSer139)	Maus, Human	WB, IF, FACS	rabbit	Cell Signaling (#2577)
Histon H3 pS10	Human, Maus	WB, FACS, IHC	rabbit IgG	Upstate (-570)
Histon H3 (tri)-methyl K9	Human, Maus	WB, IHC, IF	rabbit polyklonal	Abcam (#8898)
Ki67 (TEC-3)	Maus	IHC	rat monoklonal	DAKO (#
Mcl1 (S-19)	Maus, Human	WB, IP	rabbit ploykonal	Santa Cruz (#sc-819)

Mcm7	Maus, human	WB	mouse monoklonal	Santa Cruz (#sc-65469)
Miz1 (10E2)	Human	WB	mouse monoklonal	hergestellt von der AG Eilers
Miz1 (C-term)	Human, Maus	WB, IP	rabbit polyklonal	Santa Cruz (#sc-22837)
cleaved Parp1 (Asp214)	Human	WB, IF, FACS	mouse monoklonal	BD (-9000017)
PCNA	Maus, Human	IHC	rabbit polyklonal	Abcam (#ab18197)
p15Ink4b	Maus, Human	WB	rabbit monoklonal	Cell Signaling (#4822)
p16Ink4a (M-156)	Maus	WB	rabbit	Santa Cruz (#sc-1207)
p19Arf	Maus	WB	rabbit	Abcam (#ab80)
p21Cip1 (M-19)	Maus	WB	rabbit	Santa Cruz (#sc-471)
p27Kip1	Maus, Human	WB, IHC	goat	Santa Cruz (#sc-528G)
p53 (DO-1)	Human	WB	mouse IgG2a	Santa Cruz (#sc-126)
p57 (M-20)	Maus	WB	goat	Santa Cruz (#sc-1039)
Smad2 (pSer465/pSer467)	Maus, Human	WB	rabbit	Novus (#NB200-629)
Smad2/3 (pSer433/pSer435)	Maus	IHC	rabbit polyclonal IgG	Santa Cruz (#sc-11769-R)
TGFbeta2	Maus, Human	WB, IHC	rabbit polyklonal	Abcam (#ab53778)
TGFbeta2/3	Maus	WB	rabbit IgG	Santa Cruz (#sc-90)
Zyklin A	Maus, Human	WB, IHC	rabbit	abcam (#ab7956-1)
Zyklin B	Maus	WB	rabbit	bereitgesttel von Stefan Gaubatz
β-Aktin	Maus, Human	WB	mouse IgG1	Sigma (#A5441)
β-Tubulin	Maus, Human	WB	mouse IgG2b	Chemicon (#MAB3408)

2.3.2 Sekundärantikörper

Tab.2.4: Liste der verwendeten Sekundärantikörper.
Die Antikörper wurden nach dem Verwendungszweck geordnet (WB: Immunoblot; IF: Immunfluoresezenz; IHC: Immunhistochemie). Weitere Informationen beziehen sich auf die Konjugation und den Hersteller.

Bezeichnung	Konjugation	Applikation	Bezugsquelle
anti-mouse IgG	HRP	WB	GE Healthcare (#NA931)
anti-rabbit IgG	HRP	WB	GE Healthcare (#NA934)
anti-goat IgG	HRP	WB	Santa Cruz (#sc-2020)
anti-mouse IgG True-Blot™	HRP	WB	eBioscience.com (-8817-33)

anti-rabbit IgG True-Blot™	HRP	WB	eBioscience.com (-8816-33)
anti-rat IgG	Biotin	IHC	Vector (#BA-9400)
anti-rabbit IgG	Biotin	IHC	DAKO (#E0432)
anti-mouse IgG	HRP	IHC	Vector (#PI-2000)
anti-rabbit IgG	HRP	IHC	Vector (#PI-1000)
anti-rat IgG	HRP	IHC	GE Healthcare
anti-mouse IgG	AF 488	IF	Invitrogen (#A11001)
anti-mouse IgG	AF 647	IF	Invitrogen (#A21235)
anti-rabbit IgG	AF 488	IF	Invitrogen (#A11008)
anti-rabbit IgG	AF 647	IF	Invitrogen (#A21244)

2.4 Chemikalien

Sofern nicht anders gekennzeichnet wurden die Chemikalien in Analysequalität oder Qualität für die Mikrobiologie von den Firmen Sigma Aldrich (München), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Acros Organics (Geel, Belgien) und AppliChem (Heidelberg) bezogen. Chemikalien in höchstem Reinheitsgrad wurden von den Firmen Sigma und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Agarose für preparative Zwecke	Sekam
Bakto-Agar	Difco
Baktotrypton	Difco

2.5 Medien

2.5.1 Medien für die Bakterienkultivierung

LB-Medium	1% (w/v) Baktotrypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl
LB-Amp-Medium	LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin
LB-Amp-Agar	LB-Medium mit 1,2% (w/v) Bakto-Agar, nach dem Autoklavieren auf 50°C gekühlt und 100µg/ml Ampicillin zugefügt

2.5.2 Medien und Chemikalien für die Zellkultur

U2OS, HeLa, PHX, Hek293T	DMEM (Cambrex) 10% (v/v) FBS (Sigma) 1% (v/v) Pen/Strep (100.000 U/ml, Cambex)
Lymphomzellen, Mefs	DMEM (Cambrex) 10% (v/v) FBS (Sigma) 1% (v/v) Pen/Strep (100.000 U/ml, Cambex) 1% nicht-essentielle Aminösäuren (Cambrex) 50µM β-Mercaptoethanol
Einfriermedium	80% FBS (Sigma) 20% (v/v) DMSO

Für die Selektion auf unterschiedliche Resistenzkassetten und die Stimulation von Zellen in Zellkultur wurden folgende Chemikalien verwendet

4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) (Sigma)	200nM in Ethanol
Blastizidin (Invivogen)	30-70µg/ml
Zykloheximid (Sigma)	50µg/ml in Ethanol
Doxyzyklin (Sigma)	1µg/ml
G418 (PAA)	500µg/ml
Hygromyzin B (Merck)	100µg/ml
MG-132	25µM in Ethanol
Puromyzin (Invivogen)	1µg/ml
Plasmozin (Invivogen)	2µg/ml

2.6 Puffer und Lösungen

ACK-Lysepuffer	150 mM NH_4Cl 10 mM $KHCO_3$ 100 µM EDTA

	auf pH 7,4 mit HCl eingestellt und steril filtriert
Blockierungslösung	5% (w/v) Magermilch in TBS-T
Bradford-Lösung	8,5% (v/v) Ortho-Phosphorsäure 4,75% (v/v) Ethanol 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 filtriert mittels Filterpapier
CHIP-Lysepuffer 1	5mM PIPES (pH 8) 85mM KCl 0,5% NP40
CHIP-Lysepuffer, RIPA Puffer:	10mM Tris HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 1% NP40 1% Sodiumdeoxycholat (DOC) 0,1% SDS 1mM EDTA
CHIP-Waschpuffer1	20mM Tris (pH 8,1) 150mM NaCl 2mM EDTA 0,1% SDS 1% Triton-X 100
CHIP-Waschpuffer2	20mM Tris (pH 8,1) 500mM NaCl 2mM EDTA 0,1% SDS 1% Triton-X 100
CHIP-Waschpuffer3	0,25M LiCl 1% (v/v) NP40 1% Sodiumdeoxycholat (DOC) 1mM EDTA 10mM Tris (pH 8,1)

CHIP-Elutionspuffer	1%SDS 0,1M $NaHCO_3$ frisch zubereitet
Coomassie-Lösung	50% (v/v) Methanol 7% (v/v) Essigsäure 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
DEPC-Wasser	0,1% (v/v) DEPC in *aqua bidest*. über Nacht bei 37°C inkubiert, autoklaviert
DNA-Ladepuffer 6 x	40% (w/v) Saccharose 0,2% (w/v) Bromphenolblau 0,2% (w/v) Xylencyanol 10 mM EDTA pH 8,0
DNA-Lysepuffer	50 mM Tris pH 8,0 100 mM EDTA pH 8,0 100 mM NaCl 0,5% (w/v) SDS
HBS 2 x	280 mM NaCl 1,5 mM Na_2HPO_4 50 mM HEPES auf pH von 7,00 mit NaOH eingestellt, steril filtriert
Mowiol-Lösung	13,3% (w/v) Mowiol 4-88 33,3% (v/v) Glycerin 0,13 M Tris pH 8,5
Natriumphosphatpuffer	1 M 240 ml einer 1 M Na_2HPO_4 mit ca. 10 ml einer 1 M NaH_2PO_4 auf pH 8,0 eingestellt
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na_2HPO_3

	1,76 mM KH_2PO_4
	autoklaviert
PI-FACS-Puffer	38 mM Natriumcitrat
	54 µM Propidiumiodid
	24 µg/ml RNase A (DNase-inaktiviert, Roche)
Sammelgel 4%	4% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid
	125 mM Tris-HCl pH 6,8
	0,1% (w/v) SDS
	0,1% (w/v) APS
	0,1% (v/v) TEMED
SA-β-Gal-Färbelösung	0,1% (w/v) X-Gal (zunächst als 4% in DMF gelöst)
	0,12 mM $K_3Fe(CN)_6$
	0,12 mM $K_4Fe(CN)_6$
	1 mM $MgCl_2$
	mit PBS pH 6,0 angesetzt
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris
	250 mM Glycin
	0,1% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer 3 x	187,5 mM Tris pH 6,8
	30% (v/v) Glycerin
	6% (w/v) SDS
	0,03% (w/v) Bromphenolblau
	2 M β-Mercaptoethanol
STET-Puffer	8% (w/v) Saccharose
	50 mM EDTA
	50 mM Tris pH 8,0
	autoklaviert,
	danach 0,5% (v/v) Triton X-100 zugegeben
Stripping-Puffer (Mercapto)	62,5mM Tris pH 6,8

	2% (w/v) SDS
	100 mM β-Mercaptoethanol
Stripping-Puffer (Glycin-sauer)	200mM Glycin
	0,1% (w/v) SDS
	1% (v/v) Tween-20
	in dH_2O (pH mit HCl auf 2,3 eingestellt)
TAE-Puffer	40 mM Tris
	0,114% (v/v) Essigsäure
	1 mM EDTA
TBS-T	25 mM Tris pH 7,4 (mit HCl eingestellt)
	140 mM NaCl
	0,2% Tween-20
TNN-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,4
	120 mM NaCl
	5 mM EDTA
	0,5% NP40
	10 mM $Na_4P_2O_7$
	100 mM NaF
	2 mM Na_3VO_4
	Proteaseinhibitorcocktail und gegebenenfalls Phosphata-seinhibitorcocktail I (1:100, Sigma) frisch dazugegeben
Transferpuffer	15% (v/v) Methanol
	25 mM Tris
	150 mM Glycin
	0,01% SDS
Trenngel 10 - 15%	10 - 15% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid
	375 mM Tris-HCl pH 8,8
	0,1% (w/v) SDS
	0,1% (w/v) APS
	0,1% (v/v) TEMED

Triton-Extraktionspuffer	0,5% (v/v) Triton X-100 2 mM PMSF 0,02% NaN_3 in PBS hergestellt, Proteaseinhibitorcocktail und Phosphataseinhibitorcocktail 1 (Sigma) 1:100 frisch dazugegeben
Trypsinlösung	0,25% Trypsin 5 mM EDTA 22,3 mM Tris pH 7,4 (mit HCl eingestellt) 125 mM NaCl
Ubi-Lysepuffer	6 M Guanidiniumhydrochlorid 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 8,0 10 mM Imidazol 125 mM NaCl 0,4% (v/v) Tween-20 Proteaseinhibitorcocktail (1:100, Sigma), NEM (20 mM) und MG-132 (20 µM) frisch dazugegeben
Ubi-Waschpuffer	25 mM Tris-HCl pH 6,8 20 mM Imidazol

2.7 Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterialen, wie Zellkulturschalen und Reaktionsgefäße, wurden von den Firmen Eppendorf, Greiner, Nunc, Sarstedt und Kimberly-Clark bezogen.

2.8 Enzyme und Reaktionskits

Die Enzyme wurden, soweit nicht anderweitig gekennzeichnet, von der Firma Fermentas (St. Leon-Roth) bezogen. Es wurden Reaktionskits zur Präparation und Aufreinigung von DNA der Firma Qiagen (Hilden) und Genomed verwendet.

2.9 Geräte, Membranen und Filme

Durchflusszytometer	FACSCalibur (BD Biosciences)
Filterpapier Gel-Blotting Papier	(Schleicher und Schuell)

Fluoreszenzmikroskop	DMLB (Leica)
Mikroskop	Axiovert25 (Zeiss)
PCR-Gerät	Mastercycler epgradient S (Eppendorf)
Photometer	NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech)
PVDF-Membran	Immobilon-P PVDF Transfer Membrane (Millipore)
qRT-PCR-Gerät	Mx3000P (Stratagene)
Röntgenfilm	ECL Hyperfilm (Amersham)
Schüttelinkubator	Model G25 (New Brunswick Scientific)
SDS-PAGE-Apparatur	Minigel (Bio-Rad)
Sonifiziergerät	W-250 D (Heinemann)
Sterilarbeitsbank	HeraSafe (Heraeus)
UV-Tisch	Transilluminator (Bio-Rad)
Immunoblot-Apparatur	SD Apparatur (Harnischmacher)
Zellkulturinkubator	BBD 6220 (Heraeus)
Zentrifugen	Sorvall RC-5B Zentrifuge (DuPont Instruments) Zentrifuge 5417R (Eppendorf) Megafuge 1.0 R mit Zytospin-Einsätzen (Heraeus)

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Transformation von Bakterien

Die Transformation ermöglicht es temperaturabhängig zirkuläre DNA in Bakterien einzubringen. Dies führt zur Amplifikation des entsprechenden Plasmids. Dazu wurden 100µl chemokompetenter Bakterien mit 1µg Plasmid-DNA auf Eis inkubiert, wodurch sich die DNA an die Bakterienwand anlagern konnte. Ein Hitzeschock bei 42°C für 1min führte zu einer kurzfristigen Perforation der Bakterienwand und dadurch zu einer Aufnahme der DNA. Der Transformationsansatz wurde weitere 2min auf Eis inkubiert, bevor 700µl reines LB-Medium zugegeben wurden. Dieser Ansatz wurde 30-60min bei 37°C unter mildem Schütteln inkubiert, bevor die Bakterien in Flüssigmedium überführt oder auf LB-Agar-Platten ausplattiert wurden.

3.1.2 Anzucht von Bakterienkulturen zur Amplifikation von Plasmid-DNA

3.1.2.1 Flüssigkulturen

Um Flüssigkulturen, zum Beispiel zur Isolierung von zirkulärer DNA, zu erhalten, wurden vereinzelte Kolonien einer Plattenkultur gepickt oder ein Transformationsansatz in LB-Medium übertragen. Das LB-Medium wurde zuvor autoklaviert und mit den entsprechenden Antibiotika versetzt. Zum Animpfen einer Bakterienkultur in kleinem Maßstab (Mini-prep) wurden in der Regel 5ml Flüssigkultur verwendet. Für Plasmid-Isolationen im großen Maßstab (Maxi-Prep) wurden Flüssigkulturen bis 200ml angesetzt und über Nacht unter Schütteln (230upm) bei 37°C inkubiert.

3.1.2.2 Plattenkulturen

Um Agarplatten herzustellen wurde der Agar in der Mikrowelle aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf etwa 40-45°C konnten die entsprechenden Antibiotika zugegeben werden und der noch flüssige Agar wurde unter sterilen Bedingungen in Einweg-Plastik-Petrischalen gegossen. Nach Polymerisation des Agars konnten die Platten über mehrere Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

Bakterien wurden aus Flüssigkulturen mit einer sterilen Impföse entnommen und in Dreistrichtechnik auf der Agarplatte ausgestrichen. Nach vorangegangener Transformation wurden die Bakterien mit einem sterilen Trigalski-Spatel auf der Agaroberfläche verteilt. Die Platten wurden anschließend auf dem Deckel liegend über Nacht bei 37°C im Brutschrank

inkubiert.

3.1.3 Isolierung von bakterieller extrachromosomaler DNA

3.1.3.1 im kleinen Maßstab (Mini-Präparation)

Extrachromosomale Plasmid-DNA wurde aus einer 5ml-Übernacht-Kultur isoliert. Dazu wurden die Bakterien für 1min bei 20.000 x g abzentrifugiert und in 110µl STET-Puffer mit Lysozym (1:100) lysiert. Die Probe wurde anschließend für 1min bei 95°C im Heizblock aufgekocht. Nach einer Zentrifugation bei 20.000 x g wurde das Proteinpellet verworfen und die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA mit 110µl Isopropanol präzipitiert. Nach einem optionalen Inkubationsschritt bei -80°C wurde der Ansatz für 10min bei 20.000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet luftgetrocknet und die Plasmid-DNA in 30µl sterilem Wasser gelöst.

3.1.3.2 im großen Maßstab (Maxi-Präparation)

Die Isolierung von Plasmiden im großen Maßstab erfolgte in der Regel aus 200ml einer Übernacht-Flüssigkultur. Zur Durchführung wurde das JetSTAR 2.0 Plasmid Purification Maxi Kit der Firma Genomed (Löhne) gemäß des entsprechenden Protokolls verwendet. Die isolierte DNA wurde in *aqua bidest*. gelöst, die Konzentration des Plasmids auf 1µg/µl eingestellt und die DNA bei -20°C gelagert.

3.1.4 Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA, z.B. zur Genotypisierung, wurden die entsprechenden Proben (Stücke von Mausschwänzen, MEFs, T-Lymphozyten) in 500µl Lysepuffer aufgenommen. Um die Proteine zu verdauen wurden den Mausgeweben 50µl ProteinaseK (10µg/µl, Roche), bzw. den Zellen 5µl ProteinaseK zugegeben und über Nacht auf dem Drehrad inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 20.000 x g wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 500µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches im Verhältnis 25:24:1 durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Nach erneuter Zentrifugation (5min; 20.000 x g) wurde die obere wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500µl Isopropanol durch Zentrifugation (20min, 20.000 x g, 4°C) präzipitiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde in 70%igem Ethanol gewaschen und schließlich in 100µl *aqua bidest*. gelöst. Die DNA wurde bei 4°C gelagert.

3.1.5 Native Gelelektrophorese von DNA

Analytische Agarosegele wurden hauptsächlich verwendet, um PCR-Produkte oder Restriktionen zu überprüfen. Die Konzentration der Agarose im Gel richtete sich nach den erwartenden Fragmenten und liegt im Allgemeinen zwischen 1-2%. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht, 0,3µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und in einen Gelträger mit Gelkamm gegossen. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde der Gelkamm entfernt und die mit 6x Ladepuffer versetzten DNA-Proben in die Geltaschen pipettiert. Zum Größenvergleich wurden 2µl eines 1kb-Marker (Gibco) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 0,5-1h bei 120V. Zur Dokumentation wurde die DNA unter UV-Licht bei 254nm sichtbar gemacht und das Gel mit einer Sofortbildkamera photographiert.

3.1.6 Elution von DNA aus der Gelmatrix

Die Elution von DNA aus einem präparativen Agarosegels erfolgte mit dem *Qiaquick Spin Gel Extraktion Kit* der Firma Qiagen (Hilden) anhand des beiliegenden Protokolls. Die extrahierte DNA wurde in 30µl EB-Puffer gelöst.

3.1.7 Hydrolyse von Plasmid-DNA

3.1.7.1 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Für einen analytischen Restriktionsverdau wurden standardgemäß 1µg DNA aus einer Mini- bzw. Maxipräparation eingesetzt. Die Restriktionsendonukleasen wurden mit den entsprechenden vom Hersteller (Fermentas oder Invitrogen) gelieferten Puffern nach folgendem Protokoll verwendet:

1µg DNA
1µl 10x Reaktionspuffer
5U Restriktionsendonuklease 1
5U Restriktionsendonuklease 2 (gegebenenfalls bei einem Doppelverdau)
1µl RNaseA (bei Restriktion von DNA aus einer Mini-Preparation)
ad 10µl *aqua bidest*.

Der Ansatz wurde bei 37°C für 1-2h inkubiert und anschließend auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen (siehe 3.1.5). Bei einem präparativen Restriktionsverdau (gegebenenfalls für eine anschließende Klonierung) wurden 5-10µg DNA eingesetzt und der Gesamtrestriktionsansatz auf 30-40 µl erhöht.

3.1.7.2 Dephosphorylierung von einzelsträngiger DNA

Um eine Religation eines Plasmids mit stumpfen Enden zu vermeiden wurden vor der Ligation die überhängenden Phosphatgruppen der 3'- und 5'-Enden entfernt. Dies erfolgte nach dem folgenden Protokoll.

1µg lineare DNA
2 µl Reaktionspuffer (AAP, Fermentas)
1µl alkalische Phosphatase (Fermentas)
ad 20µl *aqua bidest*.

Der Ansatz wurde für 30min bei 37°C inkubiert. Optional konnte das Enzym durch 15minütige Inkubation bei 65°C inaktiviert werden.

3.1.8 Hybridisierung von einzelsträngiger DNA

Um shRNA-Vektoren herzustellen wurden kommerziell erworbene einzelsträngige Oligonukleotide hybridisiert um sie anschließend mit entsprechenden Expressionsplasmiden ligieren zu können (siehe 3.1.9). Der Hybridisierungsansatz wurde 3min im Wasserbad auf 95°C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

Hybridisierungsansatz:

150 pmol Oligonukleotid 1
150 pmol Oligonukleotid 2
25 µl Hybridisierungspuffer
ad 50 µl *aqua bidest*.

3.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Eine kovalente Verknüpfung von DNA Fragmenten (Insert und Vektor) wurde durch Anwendung der T4-DNA Ligase (Fermentas) ermöglicht. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert sollte im Normalfall 1:3 bis 1:5 betragen. Im Fall von zu ligierenden Oligonukleotiden (siehe 3.1.8) sollten diese im 240fachen Überschuss zum Vektor eingesetzt werden. Die Molarität von doppelsträngiger DNA lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$pmol=(\mu gDNAx10^{6})/(\text{Anzahl der Nukleotide x } 660)$$

Das Molekulargewicht von doppelsträngiger DNA ist mit 660 Dalton angegeben. Ein Standard-Ligationsansatz wurde nach folgendem Protokoll pipettiert:

100ng Vector
x ng Insert
1µl T4-Ligationspuffer
1µl T4-Ligase
ad 10µl *aqua bidest*.

Die Ligation wurde 2h bei RT oder über Nacht bei 16°C durchgeführt.

3.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*) ist eine Methode zur Amplifikation eines spezifischen DNA-Abschnitts. Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit für unterschiedliche Zwecke eingesetzt: zur Genotypisierung von Mäusen mithilfe von genomischer DNA aus Mausschwänzen (genomische PCR); zur Amplifikation einer kodierenden Sequenz zur Herstellung von Expressionsplasmiden (CDS-PCR); zur Mutagenese von kodierenden Sequenzen innerhalb von Expressionsplasmiden (Mutagenese-PCR) und zur Bestimmung von RNA-Mengen (qRT-PCR, siehe 3.1.14). Im Folgenden wird ein Standardprotokoll angegeben:

Tab.3.1: Übersicht über die verwendeten PCR-Ansätze

	Genomische PCR	CDS-PCR	Mutagenese-PCR
Primer fwd (10pmol/µl)	5µl	1µl	125ng
Primer rev (10pmol/µl)	5µl	1µl	125ng
dNTPs (10mM, Roth)	1µl	1µl	1µl
10 x Polymerasepuffer	5µl (Sigma)	5µl (mit $MgSO_4$)	5µl (Stratagene)
Sonstiges	optional 5µl DMSO		3µl Quik solution
Polymerase	2,5µl (RedTaq, Sigma)	1µl Pfu (Fermentas)	1µl (Pfu Turbo, Statagene)
DNA	3µl	1µl (1ng/µl)	1µl (10ng/µl)
aqua bidest.	ad 50µl	ad 50µl	ad 50µl

Tab.3.2: Übersicht über die verwendeten PCR-Programme

	Genomische PCR	CDS-PCR	Mutagenese-PCR
Initiale Denaturierung	94°C 5min	95°C 2min	95°C 1min
Zyklen	30x	30x	18x
Denaturierung	94°C 30sec	95°C 1min	95°C 50sec
Annealing	60°C 30sec	55°C 1min	60°C 50sec
Elongation	72°C 30sec	72°C 1min	68°C 1min
Terminale Elongation	72°C 5min	72°C 5min	68°C 7min

3.1.11 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde das Zellpellet in 1ml TriFast™ (PeqLab, Nürnberg) resuspendiert und 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 200µl Chloroform zugegeben und intensiv gemischt. Nach 3minütiger Inkubation wurde der Ansatz bei 20.000 x g 5min bei 4°C zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde, ohne die Interphase zu berühren in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1µl Glykogen (Fermentas, St.-Leon-Roth) und 500µl Isopropanol 10min bei 80°C präzipitiert. Nach Zentrifugation des Ansatzes (10min, 20.000 x g, 4°C) wurde der Überstand verworfen und das entstandene RNA-Pellet zweimal mit 75%igem Ethanol (verdünnt in DEPC- H_2O) gewaschen. Das Pellet wurde luftgetrocknet und abschließend in 20µl DEPC-H_2O bei 60°C für 2min gelöst. Falls die RNA nicht zur cDNA-Synthese verwendet wurde konnte sie nach Fällung mit 2,5 Volumenanteilen Ethanol und 10%Natriumacetat (3M, pH 4.9) bei -80°C gelagert werden.

3.1.12 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurden standardgemäß 2µg Gesamt-RNA eingesetzt. Zunächst wurde diese mit DEPC- H_2O auf ein Gesamtvolumen von 10µl vorverdünnt, 1min bei 65°C inkubiert und auf Eis abgekühlt um die Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Anschließend wurden 40µl eines vorbereiteten Mix zugegeben. Dieser setzte sich zusammen aus:

10µl 5x First-Strand Puffer (Invitrogen)
5µl DTT (0,1M, Invitrogen)

5µl dNTPs (2,5mM, Roth)
2µl Random Primer $p(dN)_6$ (2mg/ml, Roche)
0,2µl RNasin® Plus (Promega) oder RiboLock® (Fermentas)
1µl M-MLV reverse Transkriptase (200U/µl, Invitrogen)

Die cDNA wurde im 50µl Ansatz 10min bei RT, 50min bei 37°C und 15min bei 70°C synthetisiert. Eine Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

3.1.13 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Der Gehalt an Nukleinsäuren in einer Lösung wurde mit Hilfe des NanoDrop 1000 (PeqLab, Erlangen) gemessen. Neben der Konzentration wurde vom Gerät auch der Reinheitsgehalt der Nukleinsäure angeben. Dieser ermittelte sich aus dem Verhältnis der Absorption bei 280nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) zur Absorption bei 260nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren). Der Quotient sollte für DNA bei ungefähr 1,8 und bei RNA bei 2,0 liegen.

3.1.14 Quantitative reverse Transkriptase PCR (real time PCR)

Für quantitative RT-PCRs nach einer cDNA-Synthese oder nach der Immunopräzipitation von Chromatin wurde der *Absolute QPCR SYBR Green Mix* der Firma Thermo Fischer verwendet. Der Reaktionsansatz wurde nach folgendem Schema gemischt:

10µl 2x Reaktionspuffer
0,2µl Primer fwd (10pmol/µl)
0,2µl Primer rev (10pmol/µl)
8,6µl *aqua bidest*.
1µl DNA

Zur Amplifikation und Detektion der SYBR-*green*-markierten DNA wurde das PCR-Gerät Mx3000P (Agilent Technologies, Stratagene) verwendet. Das verwendete Programm enthielt folgendes PCR-Temperaturprofil:

95°C	15min					
95°C	15sec;	60°C	20sec;	72°C	15sec	38-42 Zyklen
95°C	1min;	60°C	30sec;	95°C	30sec	

Bei Amplifikation humaner DNA dienten *B2M* und *S14* als Haushaltsgene, in murinen Zellen wurden *S16* und *Actb* verwendet. Die Messungen wurden stets in Triplikaten durchgeführt und die Standardabweichung nach dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetzt berechnet.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von Zellen

Um Kontaminationen durch Pilze und Bakterien zu vermeiden, wurden Zellkulturarbeiten ausschließlich an einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Die Zellen wurden in CO_2-Inkubatoren bei 37°C und 5% CO_2-Gehalt in gesättigter Wasserdampfatmosphäre (85%) kultiviert. Dadurch wurden die auf physiologische Werte eingestellten pH-Werte der CO_2/Bicarbonat-gepufferten Medien aufrechterhalten

3.2.1.1 Kultivierung adhärenter Zellen

Die Kultivierung adhärenter Zellen erfolgte in der Regel auf sterilen 10cm Zellkulturschalen. Die Zellen wurden vor dem Erreichen vollständiger Konfluenz passagiert. Dazu wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen. Durch Zugabe von 1ml Trypsin und 1-10minutiger Inkubation bei 37°C (Inkubationszeit variierte je nach Zelltyp) wurden die Zellen von ihrer Wachstumsunterlage abgelöst. Die enzymatische Rektion wurde durch Zugabe von 9ml Zellkulturmedium gestoppt und die Suspension zur Vereinzelung der Zellen mehrmals auf- und abpipettiert. Abschließend wurde ein bestimmter Teil der Zellsuspension auf eine Zellkulturschale überführt und mit frischem Zellkulturmedium auf 10ml aufgefüllt.

3.2.1.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden standardgemäß in Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurden diese durch Auf- und Abpipettieren der Suspension vereinzelt und ein gewisser Anteil in eine frische Zellkulturflasche überführt. Diese wurde mit frischem Zellkulturmedium aufgefüllt.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Eukaryotische Zellen werden zur längerfristigen Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dafür wird ein DMSO-haltiges Einfriermedium verwendet, da DMSO durch seine hygroskopischen Eigenschaften die Bildung von Eiskristallen unterbindet und damit der Schädigung von Zellen vorbeugt.

Zellen von einer 60-70% konfluenten Platte oder Flasche wurden in 300µl Einfriermedium resuspendiert und in sterile Einfrierröhrchen überführt. Diese wurden in Styroporboxen oder umwickelt mit Papiertüchern zunächst bei -20°C und nach 24h bei -80°C langsam eingefroren.

Einen weiteren Tag später konnten sie zur Lagerung in die Dampfphase von flüssigem Stickstoff überführt werden.

Zum Auftauen wurden die eingefrorenen Zellen im 37°C Wasserbad erwärmt, in 10ml Kulturmedium aufgenommen und ausplattiert. Sobald die Zellen sich auf der Zellkulturschale angeheftet hatten wurden sie mit 1xBS gewaschen und ein Mediumwechsel durchgeführt, um das schädliche DMSO von den Zellen zu entfernen.

3.2.3 Transfektion von Zellen

3.2.3.1 Transfektion von Plasmid-DNA

3.2.3.1.1 Kalzium-Chlorid-Präzipitation

Wird Kalzium mit einer Phosphatlösung vermischt, fällt es in Form mikroskopisch sichtbarer Kristalle aus. Durch Zugabe von DNA zur Kalziumlösung präzipitiert diese auf Grund ihrer Phosphatgruppen ebenfalls und kann durch Phagozytose in Zellen aufgenommen werden.

Einen Tag vor Transfektion wurden die Zellen in entsprechender Dichte ausplattiert. Um Kalzium-Phosphat zu präzipitieren, wurden 500µl 2xHBS in einem 15ml Reaktionsgefäß vorgelegt. In ein weiteres 15ml Reaktionsgefäß wurde ein DNA-Kalzium-Gemisch nach folgendem Schema pippetiert:

1-30µg DNA
50µl $CaCl_2$
ad 500µl *aqua* braun

Das DNA-Kalzium-Gemisch wurde tropfenweise in die HBS-Lösung pipettiert, wobei gleichzeitig eine intensive Durchmischung des Ansatzes durch Zufuhr von Luftblasen mittels einer Pasteurpipette durchgeführt wurde. Das Gemisch wurde unverzüglich auf die Zellen gegeben und 12h inkubiert bevor ein Mediumwechsel erfolgte, um die Präzipitate zu entfernen.

Zur Virusproduktion in Phoenix-Zellen wurden im Allgemeinen 30µg DNA transfiziert. 48h nach Transfektion wurde der erste Virusüberstand abgenommen, zentrifugiert (400 x g, 5min, 4°C) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Den Zellen wurde frisches Medium zugeführt. Nach weiteren 12h wurde der zweite Virusüberstand abgenommen und die Zellen verworfen.

Zur Transfektion von Expressionsplasmiden variierte die Menge an DNA je nach Plasmid bzw.

Kombination mehrerer Plasmide sollte allerdings die Gesamtmenge von 30µg nicht übersteigen. Je nach Experiment wurden die Zellen nach 36-60h nach Transfektion geerntet (siehe 3.3.1).

3.2.3.1.2 PEI-Transfektion

Gelegentlich wurde die Transfektion auch unter Zuhilfenahme des kationischen Polymers Polyethylimins (PEI) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen einen Tag vor Transfektion in antibiotikafreiem Medium mit 2% Serum ausplattiert.

Vor der Transfektion wurden 6µg DNA und 500µl OptiMEM in ein 1,5ml Reaktionsgefäß pipettiert. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 12µl PEI mit 500µl OptiMEM gemischt. Beide Ansätze wurden 5min bei RT inkubiert, bevor sie vermischt wurden und weitere 15min inkubierten. Der Ansatz wurde gleichmäßig auf die Zellen getropft und diese für 4-8h im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel um eine toxische Wirkung des PEI auf die Zellen zu minimieren.

3.2.3.2 Transfektion von siRNA

Die Transfektion von Zellen mit siRNA erfolgte im Allgemeinen auf 6cm-Schalen. Einen Tag vor Transfektion wurden die Zellen in antibiotikafreiem Medium ausplattiert. Zur Transfektion wurden 10µl Lipofectamin™ RNAiMAX mit 500µl OptiMEM in einem 1,5ml Reaktionsgefäß gemischt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 6µl (30µM) siRNA Oligo (Dharmacon) in 500µl OptiMEM verdünnt. Beide Ansätze wurden 5min inkubiert und anschließend vereinigt. Der Transfektionsansatz wurde 20min bei RT inkubiert und tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 24h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen konnten 48-72h nach Transfektion geerntet werden.

3.2.4 stabile retrovirale Infektion von Zellen

3.2.4.1 Infektion von adhärenten Zellen

Zur stabilen Infektion adhärenter Zellen wurden zunächst 3ml Virusüberstand mit 2ml Medium und 4µg/ml Polybren (Hexadimethrinbromid, Sigma) gemischt. Die am Vortag ausplattierten zu infizierenden Zellen wurden in PBS gewaschen und für mindestens 12h mit dem Infektionsgemisch inkubiert, bevor 5ml frisches Medium zugegeben wurden. 24-48h nach der Infektion konnte mit der Selektion der erfolgreich infizierten Zellen unter Verwendung der entsprechenden Antibiotika begonnen werden.

3.2.4.2 Infektion von Suspensionszellen (Spinokulation)

Um Suspensionszellen zu infizieren wurden zunächst 200.000 Zellen in 200µl in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1,8ml Virusüberstand und 4µg/ml Polybren (Hexadimethrinbromid, Sigma) wurde das Zell-Infektionsgemisch für mindestens 2,5h bei 2000 x g und 32°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, die pelletierten Zellen in 200µl frischem Medium resuspendiert und in ein *V-bottom-well* überführt. Optional erfolgte nach 12-16h die zweite Spinokulation. 48h nach der Infektion wurde mit der Selektion der infizierten Zellen unter Verwendung der entsprechenden Antibiotika begonnen.

3.2.4.3 Lentivirale Infektion

Die Herstellung von Lentiviren und die Infektion von Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen der Sicherheitsstufe S2. Zur Virusherstellung wurden HEK293T Zellen mit 5μg des entsprechenden lentiviralen Vektors mit PEI (siehe 3.2.3.1.2) transfiziert. Zusätzlich wurden 3,25μg des psPAX2 und 1,75μg des pMD2.G kotransfiziert. Um stabilen Virus zu erhalten wurden 25μM Chloroquin in das Medium zugegeben. Nach 24h wurde der erste Virusüberstand abgenommen und durch ein 0,2μm-Filter sterilfiltriert. Weitere Virusüberstände konnten nach 36 und 48h geerntet werden. Die lentivirale Infektion erfolgte wie unter 3.2.4.1 und 3.2.4.2 beschrieben.

3.2.5 Kultivierung von Zellen zur Induktion von Apoptose

Zur Untersuchung von Myc-induzierter Apoptose wurden U2OS MycER Zellen verwendet. Zunächst wurden 500.000 Zellen in Vollmedium auf eine 10cm-Schale ausplattiert. Nach 12-24h wurde das Medium entfernt und durch Mangelmedium mit 0,05% FBS ersetzt. Nach weiteren 48h erfolgte die Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) in einer Endkonzentration von 200nm um das an des Östrogenrezeptor fusionierte Onkogen Myc zu aktivieren. Je nach Versuch wurden die Zellen zu entsprechenden Zeitpunkten nach Tamoxifenzugabe geerntet und analysiert.

3.2.6 Bestrahlung von Zellen mit UVB/UVC

Zur Induktion der DNA-Schadensantwortkaskade wurde im Allgemeinen UVB oder UVC verwendet. Die adhärenten Zellen wurden ohne Medium und ohne Deckel 1min unter der UVB/UVC-Lampe bestrahlt. Anschließend wurde das zuvor entfernte Medium wieder zugegeben und die Zellen zu entsprechenden Zeitpunkten nach Bestrahlung geerntet.

3.2.7 Propidiumiodid-Durchflusszytometrie

Der Farbstoff Propidiumiodid (PI) interkaliert sequenzunspezifisch innerhalb Nukleinsäuren und verstärkt deren Fluoreszenz um das 20-fache. Daher wird PI vorwiegend in der Durchflusszytometrie angewendet um den DNA-Gehalt von Zellen zu messen und diesen den unterschiedlichen Phasen das Zellzyklus' zuzuordnen.

Das Medium der zu untersuchenden Zellen wurde in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen mit Trypsin von der Wachstumsoberfläche abgelöst (siehe 3.2.1.1). Die Zellen wurden in dem Zellkulturüberstand resuspendiert, in das Reaktionsgefäß überführt und bei 400 x g sedimentiert. Nach zweimaligem Waschen in 1xPBS wurde das Zellpellet in 500µl PBS resuspendiert und die Zellen durch vorsichtiges Hinzutropfen von eiskaltem EtOH unter ständiger Zirkulation mittels Vortexen fixiert. Die Zellen wurden mindestens über Nacht bei -20°C gelagert.

Zur Aufbereitung der fixierten Zellen wurden sie zweimal in 1xPBS gewaschen und während jedem Waschschritt bei 400 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 400µl PI-Puffer resuspendiert und 30min bei RT im Dunkeln inkubiert.

Die Messung erfolgte am FACSCalibur™ (BD Biosciences) bei einer Anregungswellenlänge von 488nm und einer Emission von 617nm für Propidiumiodid (Detektor FL2). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm CellQuest Pro (BD Biosciences).

3.2.8 Kaspase-3 Durchflusszytometrie

Kaspase-3 ist die Hauptprotease, die in frühen Stadien der Apoptose aktiviert wird. Das inaktive 32kDa schwere Pro-Enzym wird in eine schwere (17kDa) und eine leichte (12kDa) Untereinheit gespalten, die miteinander assoziieren und somit das aktive Enzym bilden. Die aktive Kaspase ist in der Lage weitere Kaspasen zu aktivieren und somit die Kaskade der Apoptose voranzutreiben.

Die Messung der aktiven Kaspase in der Durchflusszytometrie bietet eine Möglichkeit frühe Apoptose zu detektieren und zu quantifizieren. Dazu wurde das *FITC-conjugated Monoclonal Active Caspase3 Antibody Apoptosis* Kit (BD Biosciences) den Angaben des Herstellers entsprechend eingesetzt.

3.2.9 Giemsa-Färbung von Zellen

Zum schnellen Nachweis von Unterschieden im Zellwachstum oder der Apoptoseinduktion wurde das Medium adhärent wachsender Zellen entfernt und diese gründlich mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 10ml einer Giemsa-Gebrauchslösung für 45min gefärbt. Die

Färbelösung wurde verworfen und eventuelle Reste durch Waschen der Platten in Leitungswasser entfernt. Nachdem die Platten getrocknet waren, konnten sie makroskopisch ausgewertet werden.

3.2.10 Seneszenz-assoziierte beta-Galaktosidase Färbung von Suspensionszellen

Das Enzym beta-Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse von Beta-Galaktosiden zu Monosacchariden ausschließlich in seneszenten Zellen. Die angewandte Methode bezieht sich auf die Spaltung des chromogenen Substrats X-Gal zu einem blauen, im Lichtmikroskop sichtbaren Farbstoffs.

Suspensionszellen wurden in 1xPBS gewaschen und durch eine 0,5%ige Glutardialdehydlösung (in PBS) für 10min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen in 1mM $MgCl_2$ gewaschen und mit der Färbelösung bei 37°C gefärbt, bis eine Blaufärbung eintrat. Zum Abstoppen der Reaktion konnte die Zellen mit PBS gewaschen und über einen Zeitraum von mehreren Tagen gelagert werden.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Ernte von Zellen

Um Zellen für einen Versuch zu ernten, wurde zunächst das Zellmedium mittels einer Absaugpumpe entfernt. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem 1xPBS gewaschen, mit einem Zellscharber von ihrer Wachstumsunterlage abgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Um restliches PBS zu entfernen, wurden sie Zellen durch Zentrifugation (400 x g, 5min, 4°C) pelletiert und schließlich in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Alle Arbeitsschritte erfolgten auf Eis.

3.3.2 Herstellungen von Proteinlysaten

3.3.2.1 Gesamtzelllysate

Proteinpellets wurden langsam auf Eis aufgetaut und in einem angemessenen Volumen Lysepuffer, der zuvor mit Proteinaseinhibitoren versetzt worden ist, aufgenommen. Nach einer Inkubation von 10min auf Eis wurden die Lysate kurz bei -80°C eingefroren und anschließend wieder aufgetaut. Durch Zentrifugation (20.000 x g, 5min, 4°C) wurden Zelltrümmer und Reste des Chromatins pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Zur Analyse von meist zytoplasmatischen und nicht-Chromatin-gebundenen Proteinen wurde eine Lyse in Niedrigsalzpuffer (TNN) durchgeführt. Wurden hauptsächlich nukleäre Proteine untersucht mussten Lysate in Hochsalzpuffer (RIPA) hergestellt werden.

3.3.2.2 Histonextraktion durch HCl-Lyse

Histone sind auf Grund ihrer starken Interaktion mit der DNA schwer durch Standardlysemethoden vom Chromatin zu trennen. Zur sauren Lyse wurden Zellpellets zunächst in einem angemessenen Volumen Triton-Extraktionspuffer resuspendiert und abzentrifugiert (400 x g, 10min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet erneut in Triton-Extraktionspuffer gewaschen und anschließend in 50-100µl 0,2M HCl resuspendiert. Die Extraktion der Histone erfolgte über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad. Die Proben wurden durch Zugabe von 10-20µl 1M NaOH neutralisiert, noch vorhandene Zelltrümmer abzentrifugiert (20.000 x g, 10min, 4°C) und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

3.3.2.3 Herstellung von nukleären Extrakten

Zur Fraktionierung in zytoplasmatische und nukleoplasmatische Fraktionen wurden Zellpellets zunächst in 200µl Puffer A resuspendiert, 15-20min auf Eis inkubiert, 20sec gevortext und bei 1.700 x g für 3min zentrifugiert. Der Überstand wurde als zytoplasmatische Fraktion in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde einmal in Puffer A gewaschen und anschließend in 30µl Puffer B resuspendiert. Um den Nukleus zu lysieren, wurde der Ansatz 20min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 20.000 x g für 7min konnte der Überstand als nukleoplasmatische Fraktion in ein frisches Reaktionsgefäß überführt werden. Das verbleibende Pellet konnte gegebenenfalls in 3xSDS Lysepuffer aufgenommen werden und entspricht der Chromatin-assoziierten Fraktion.

3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung des Proteingehalts in Zelllysaten erfolgte durch die von Bradford beschriebene Methode (Bradford, 1976). Die Proteinkonzentration lässt sich anhand einer festgelegten Eichgeraden ermittelt, die mit BSA (1µg/µl) als Standard festgelegt wurde. Zur Messung wurden 100µl 150mM NaCl in Plastikküvetten vorgelegt, 1µl der Probe hinzupipettiert und der Ansatz durch Zugabe von 900µl Bradford-Lösung durchmischt. Nach 5minütiger Inkubation konnte die Absorption in einem Photometer bei 595nm gemessen werden.

3.3.4 Protein-Komplex-Immunopräzipitation (Co-IP)

Eine Immunopräzipitation ermöglicht die Konzentration eines bestimmten Proteins aus einem Lysat durch Anwendung eines gegen dieses Protein gerichteten Antikörpers. Als Co-IP bezeichnet man die Präzipitation eines intakten Proteinkomplexes um Protein-Protein Wechselwirkungen aufzuklären. Dabei werden zusätzlich zu dem bestimmten Protein auch Interaktionspartner des Proteins aus dem Zelllysat präzipitiert.

Nach Herstellung von Proteinlysaten in einem wenig stringenten Puffer (TNN oder IPH) wurden die Zellen zusätzlich sonifiziert, um die Zellkerne aufzubrechen (4x 5min, 20%, 20s Pause). Nach Zentrifugation wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration gemessen um gleiche Mengen an Protein für die IP einzusetzen. In der Regel wurden 1,5-3mg für eine endogene IP, bzw. 0,5mg für eine exogene IP eingesetzt. Zur Kontrolle des Inputs wurden 10% des Lysats abgenommen und mit 3xSDS Ladepuffer versetzt. Dem IP-Lysat wurden 1% BSA zugegeben.

Zunächst wurde jeder IP-Ansatz 2h bei 4°C mit je 50µl in Lysepuffer gewaschenen und resuspendierten Sepharose-G Beads (Sigma-Aldrich) vorinkubiert um unspezifisch an die Beads bindende Proteine zu entfernen. Die Lysate wurden bei 100 x g zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation wurden 2µg des entsprechenden Antikörpers zugegeben und über Nacht bei 4°C in einem Drehrad inkubiert. Durch Zugabe von je 50µl Beads zu dem Präzipitat für 2h bei 4°C im Drehrad konnte die Bindung der Antikörper an die Sepharose-Beads erfolgen. Die Beads wurden bei 100 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließen wurden die Beads fünfmal im Lysepuffer gewaschen und zuletzt in 3xSDS Ladepuffer aufgenommen. Durch Aufkochen der Beads bei 95°C für 5min wurden die präzipitierten Proteine eluiert und konnten mittels SDS-Page (siehe 3.3.6) analysiert werden.

3.3.5 *In vivo* Ubiquitinierungs-Untersuchung

Zum Nachweis von Ubiquitinierung einer E3-Ligase auf ein speziellen Substrat wurden *in vivo* Ubiquitinierungs-Untersuchungen durchgeführt. Dafür wurden Zellen zunächst mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert und 36-42h nach Transfektion für 4h mit MG-132 behandelt um die ubiquitinierten Substrate anzureichern. Die Zellen wurden geerntet (siehe 3.3.1), ein Teil der Zellen (10%) entnommen und als Inputprobe mit 3xSDS versetzt. Die übrigen Zellen wurden abzentrifugiert und in 1ml Guanidiniumhydrochlorid-haltigem Puffer lysiert. Dem Puffer war zuvor 50µM NEM, MG-132 und PI (1:1000) zugesetzt worden. Um die Viskosität des Zelllysats zu verringern, wurde der Ansatz bei 20% Amplitude 4x5s im Kühlraum sonifiziert.

Nach Zentrifugation (20.000 x g, 10min, 4°C) wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der His_6-markierten Proteine wurden pro Ansatz 50µl in PBS gewaschene Kobaldt-Beads (Talon Superflow, Clontech) eingesetzt und für über Nacht bei 4°C rotiert. Anschließend wurden die Beads abzentrifugiert (400 x g, 1min, 4°C) und der Überstand verworfen. Die Beads wurden nacheinander dreimal in Guanidiniumhydrochlorid-haltigem Puffer, zweimal in einem 1:4 Gemisch aus Guanidiniumhydrochlorid-haltigem Puffer und Imidazol-haltigem Puffer und zweimal in Imidazol-haltigem Puffer gewaschen. Zuletzt wurden die Beads in 3xSDS-Ladepuffer/200mM Imidazol aufgenommen. Durch Erhitzen der Proben für 5min bei 95°C wurden die Proteine aus den Beads eluiert und konnten auf einem SDS-Polyacrylamidgel mit anschließendem Immunoblot analysiert werden.

3.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch denaturierende PAGE werden Proteine im elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Die Probenvorbereitung, Herstellung der Gele und Durchführung der Elektrophorese erfolgte nach der von Laemmli beschriebenen Methode (Laemmli, 1970).

10-20µg der Proteinlysate wurden mit 3xSDS-Ladepuffer versetzt und 5min bei 96°C gekocht. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben in die Geltaschen eines 7,5-17,5%igen Trenngels mit 4%igem Sammelgel pippetiert. Zur Abschätzung der Proteingröße wurden 2,5µl eines Proteinmarkers für kleinere Proteine (Fermentas) oder 7µl eines Proteinmarkers für größere Proteine (Invitrogen) aufgetragen. Die Konzentration der Proben im Sammelgel erfolgte bei 60-70V, im Trenngel konnte die Spannung bis 120V erhöht werden. Nach der Elektrophorese wurde der Anteil des Sammelgels verworfen und das Trenngel zum Proteintransfer verwendet.

3.3.7 Immunoblot

Die Methode das Transfers von Proteingemischen aus einem Polyacrylamidgel auf einen Träger über Kapillartransfer oder Elektronentransfer bezeichnet man als Westernblot oder Immunoblot.

Die auf die Maße des Polyacrylamidgels zugeschnittene PVDF-Membran (Immobilion-P, Millipore) wurde in Methanol äquilibriert, in H_2O gewaschen und im Transferpuffer für wenige Minuten inkubiert. Ein Stapel von 3MM Whatman-Papier sowie das Gel wurden ebenfalls in Blotpuffer inkubiert.

Die PVDF-Membran wurde durch das Gel bedeckt, von je einem Stapel Whatman-Papier und je einem Schwamm flankiert und durch spezielle Plastikrahmen fixiert. Um ein homogenes

elektrisches Feld zu bilden, war auf eine luftblasenfreie Anordnung des Blots zu achten. Der Plastikrahmen wurde in eine Blotapparatur gespannt und diese mit Transferpuffer vollständig gefüllt. Der Transfer erfolgte im Kühlraum bei 250V. Die Dauer des Transfers richtete sich nach der Größe der zu transferierenden Proteine.

3.3.8 Detektion von Proteinen durch Immunofärbung und ECL-Detektion

Die Membran wurde auf dem Schüttler für eine Stunde in 5% Magermilchpulver in TBS-T blockiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Anschließend wurde der erste Antikörper in der Blockierungslösung entsprechend verdünnt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Um überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran fünfmal je 10min bei RT gewaschen, bevor sie mit dem zweiten Antikörper in entsprechender Verdünnung für eine Stunde bei RT inkubiert wurde. Darauf folgten weitere fünf Waschschritte um den ungebundenen zweiten Antikörper zu entfernen.

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit dem Immobilon™ Western Detection Kit (Millipore), gemäß den Angaben des Herstellers. Die Lösung wurde 5Minuten auf der Membran inkubiert und anschließend entfernt. Ein Röntgenfilm wurde je nach Signalstärke für 30sec bis 30min im Dunkeln aufgelegt und anschließend entwickelt.

3.3.9 Strippen von PVDF Membranen

3.3.9.1 mit Mercaptoethanol-haltigem Puffer

Die Entfernung von gebundenem Antikörper mit Hilfe von Mercaptoethanol wurde angewendet, wenn ein starkes Signal bei der weiteren Antikörperdetektion zu erwarten war. Dazu wurde die Membran in Mercaptoethanol-haltigem-Puffer für 30min bei 60°C inkubiert um damit gebundene Antikörper abzulösen. Anschließend wurde die Membran sorgfältig mit destilliertem Wasser gewaschen und mit 5% Magermilchpulver in TBS-T blockiert. Nun konnte mit der erneuten Inkubation von Antikörpern begonnen werden.

3.3.9.2 mit Glycin-sauer

Um ein zweites, schwächeres Signal auf einer bereits verwendeten Membran detektieren zu können wurde diese mit Glycin-haltigem Puffer für 2h bei RT inkubiert. Die Rückstände des Puffers wurden durch Spülen mit destilliertem Wasser entfernt und die Membran in 5% Magermilchpulver in TBS-T blockiert. Die Inkubation des zweiten Primärantikörpers erfolgte wie beschrieben (siehe 3.3.8).

3.3.10 indirekte Immunfluoreszenz

Auf Glasplättchen gewachsene Zellen wurden für 10min in 4% Paraformaldehyd fixiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. In diesem Zustand konnten die Zellen über einen längeren Zeitraum bei 4°C aufbewahrt werden.

Zur Inaktivierung des Paraformaldehyds wurden die Zellen zweimal je 10min in PBS/0,1M Glycin inkubiert. Anschließend erfolgte eine Permeabilisierung der Zellmembran durch PBS/0,1%NP-40 für zweimal 5min. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 45minütige Blockierung in PBS/0,1%NP-40/5%FBS abgedeckt. Der erste Antikörper wurde entsprechend in PBS/0,1%NP-40/5%FBS verdünnt und 45min bei 37°C mit den Zellen inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen in PBS/0,1%NP-40/5%FBS für je 5min erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper in entsprechender Verdünnung bei 45min bei 37°C oder 120min bei RT. Gleichzeitig mit der Kopplung des zweiten Antikörpers konnte eine Kernfärbung durch DAPI erfolgen.

Anschließend wurden die Zellen dreimal in PBS/0,1%NP-40 gewaschen, erst in PBS dann in H_2O getaucht und mit Mowiol eingedeckelt.

3.3.11 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Methode der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) wurde angewendet, um Proteine auf bestimmten DNA-Sequenzen proteinbiochemisch nachzuweisen. Dazu wurden zunächst die Proteine mit der DNA durch Zugabe von 1% Formaldehyd in das Zellmedium vernetzt. Nach 10minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch 0,125M Glycin gestoppt und 5min inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert und 2mal in 1xPBS gewaschen. Nach diesem Schritt konnten die Zellen bei -80°C gelagert werden.

Zur Lyse der Zellen wurden diese 20min in Lyse Puffer 1 auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das verbleibende Pellet wurde erneut 10min auf Eis in Lyse Puffer 2 lysiert, bevor das Lysat in entsprechenden Aliquots in 15ml Reaktionsgefäße überführt wurde. Zum Fragmentieren der DNA wurden die Aliquots, gekühlt in einem Ethanol-Eis-Gemisch, sonifiziert (Bipraptor Protokoll: 9x30sec, 30sec Pause, 2x) und anschließend 15min bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vereint und nach Abnahme eines 50µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration und der Qualität des Chromatins wurde das Aliquot nach Zugabe von je 2µg RNaseA und ProteinkinaseK bei 55°C für 3h und anschließend bei 65°C über Nacht revertiert.

Die Qualität des Chromatins wurde auf einem 1,5%igen Agarosegel analysiert, wobei der Hauptanteil des Chromatins eine Größe von 200-500bp aufweisen sollte.

Zur Vorbereitung der Sepharose-G Beads wurde das entsprechende Volumen in 15ml RIPA Puffer gewaschen und anschließend in 10ml RIPA aufgenommen. Die Beads wurden nach Zugabe von 1mg/ml BSA und 400µg/ml *Salmon sperm DNA* über Nacht unter Rotation bei 4°C blockiert.

Das Gesamtchromatin wurde aufgetaut und mit 60µl der blockierte Sepharose-G Beads für 60min bei 4°C unter permanenter Rotation präinkubiert. Für die anschließende Immunopräzipitation wurde die Beads abzentrifugiert und das Chromatin mit 2µg des relevanten Antikörpers oder des Kontrollantikörpers über Nacht unter Rotation inkubiert. 1% des Chromatins wurde zuvor abgenommen und als Input bei 4°C gelagert.

Nach Zugabe von 60µl der blockierten Beads zu dem Antikörper-Chromatin-Gemisch konnte der Antikörper für 2h bei 4°C bei permanenter Rotation an die Beads gekoppelt werden. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen wurden die sedimentierten Beads nacheinander zweimal in Waschpuffer 1, dreimal in Waschpuffer 2, viermal in Waschpuffer 3 und zweimal in TE (pH8.0) gewaschen. Bei jedem Waschschritt in einem neuen Puffer wurden die Reaktionsgefäße gewechselt.

Um die DNA von den Beads zu lösen, wurden sie in 250µl Elutionspuffer aufgenommen, kurz gevortext und 15min bei RT unter Rotation inkubiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Beads ein weiteres Mal in Elutionspuffer inkubiert. Die Eluate aus den beiden Elutionsschritten wurden vereinigt.

Die Inputproben und das Eluat wurde nach Zugabe von 0.2M NaCl, 0.01M EDTA, 0.04M Trist (pH 6.5), 2µg RNaseA und 2µg ProteinaseK erst für 3h bei 55°C und anschließend über Nacht bei 65°C revertiert.

Zur Aufreinigung des Chromatins wurde das PCR Purification Kit der Firma Roche oder das Qiaquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen gemäß den Bestimmungen des Herstellers verwendet. Die DNA wurde in 50µl EB Puffer eluiert.

Die aufgereinigte DNA das Inputs sowie der Immunopräzipitation konnte mittels quantitativer Real-Time PCR (siehe 3.1.13) analysiert werden.

3.4 Tierexperimentelle Methoden

3.4.1 Zucht von Mäusen

Die Maushaltung erfolgte unter keimarmen Bedingungen in belüfteten Käfigen bei einer Raumtemperatur von 20°C in einem künstlichen Hell-Dunkel-Zyklus. Ab einem Alter von 6Wochen konnte Männchen und Weibchen verpaart werden. Die Nachkommen wurden im Alter von 3-4 Wochen am Ohr markiert und genotypisiert. In diesem Alter wurden sie von den Elterntieren getrennt und geschlechtsspezifisch in Käfige aufgeteilt.

3.4.2 Intraperitoriale Injektion von Mäusen

Zur Detektion proliferierender Zellen in Mausgewebe wurde Mäusen 3h vor Organentnahme 200µg des Thymidinanalogons Bromodeoxyuridine (BrdU) subkutan injiziert. Als Kontrolle wurde der Maus neben dem Organ von Interesse ein Stück des Duodenums entnommen, um die vollständige Inkorporation von BrdU zu kontrollieren.

3.4.3 Organentnahme aus Mäusen

Zunächst wurde die Maus ca.30s mit Isofluran (Baxter) anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet. Nach einer äußerlichen Desinfektion in 70% EtOH wurden die Extremitäten der auf dem Rücken liegenden Maus auf einer Styroporplatte fixiert und die Bauchhöhe, sowie der Brustkorb geöffnet. Die entnommenen Gewebe wurden in 1xPBS gewaschen und anschließend entsprechend ihrem Verwendungszweck weiterverarbeitet.

3.4.4 Isolierung von T-Lymphocyten

Um T-Lymphocyten aus entnommenen Thymi oder T-Zell-Lymphomen zu isolieren, wurde das entsprechende Gewebe zunächst mit einem Skalpell in PBS zerkleinert und mittels der Rückseite einer 10ml Spritze durch ein Zellsieb (Porengröße 70µm, BD Biosciences) homogenisiert. Um die im Gewebe enthaltenen Erythrozyten zu entfernen, wurden die Zellen bei RT mit 5ml ACK-Lysepuffer inkubiert. Nach 3min wurde die Reaktion durch Zugabe von 40ml 1xPBS abgestoppt und die Zellen für 5min bei 400 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1xPBS aufgenommen und die Zellen dem entsprechenden Verwendungszweck (Protein, RNA, DNA Isolation, Durchflusszytometrie) zugeführt.

3.4.5 Herstellung von Paraffinschnitten

Frisch entnommene Organe würden über Nacht bei 4°C in Formalin fixiert. Anschließend wurden

sie zweimal in PBS gewaschen und anschließend nacheinander für je 1h in 30%, 50% und 70% Ethanol inkubiert. In diesem Zustand konnten sie einen längeren Zeitraum gelagert werden, bevor sie mit Paraffin in eine Gussform eingebettet wurden.

Parafinschnitte wurden an einem Mikrotom mit einer Schichtdicke von 5µm erstellt und bis zur Verwendung für immunhistochemische Färbung bei RT gelagert.

3.4.6 Herstellung von Kryoschnitten

Um enzymatische Reaktionen in Mauspräparaten nachzuweisen (z.B. SA-beta-Gal) wurden frisch entnommene Organe auf einem Whatman-Papier von dem Gewebeklebstoff OCT (Tissue Trek, Sarkura) umhüllt und in diesem Zustand in ein durch flüssigen Stickstoff gekühltes Becken von Isopentan gegeben. Anschließend wurden die Gewebe schockgefroren und in Alufolie bei -80°C gelagert.

Kryoschnitte wurden in einem Kryomikrotom bei -20°C mit einer Schnittdicke von 5-10µm erstellt und umgehend in 0,5% Glutardialdehyd (in PBS) fixiert. Nach drei Waschschritten in 1mM MgCl2/PBS für je 5 min bei RT konnten die Schnitte über einen längeren Zeitraum bei 4°C gelagert werden.

3.5 Immunhistochemische Methoden

3.5.1 Entparaffinisierung von Geweben

Die Entparaffinisierung von in Paraffin eingebetteten Geweben wurde auf folgende Weise durchgeführt:

Zunächst wurden die Gewebe dreimal für je 5min in Xylol, daraufhin je zweimal in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 95%, 70%, 50%) für 3min inkubiert. Zuletzt erfolgte ein Waschschritt in H_2O bevor die Schnitte einer immunhistochemischen Färbung unterzogen werden konnten.

3.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Paraffinschnitten

Zur Untersuchung von Zell- und Gewebestrukturen wurden Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Hämatoxylin dient als Mittel um Zellkerne anzufärben und wird in Kombination mit dem kontrastreichen Zytoplasmafarbstoff Eosin gegengefärbt.

Die entparaffinisierten Gewebe werden kurz in eine Hämatoxylin-Gebrauchslösung getaucht und

anschließend für 15min in flüssigem Leitungswasser gespült. Danach wurden sie mit einer 0,1%igen Eosinlösung gefärbt.

3.5.3 Antikörperspezifische Färbung von Paraffinschnitten

Zur Detektion endogen im Mausgewebe vorkommender Proteine bieten sich zwei Methoden an. Zum einen die Peroxidase-gekoppelte Enzymreaktion, die vor allem eine lange Haltbarkeit der Färbung verspricht und die Fluoreszenz-gekoppelte Färbung, die durch Anwendung verschiedener Sekundärantikörper eine unkomplizierte Doppelfärbung von Proteinen im Fluoreszenzmikroskop ermöglicht.

3.5.3.1 Enzymgekoppelte Färbung

Entparaffinisierte und gewaschene Schnitte wurden 10min in 3%iger H_2O_2-Lösung inkubiert, um endogene Peroxidasen zu inhibieren. Die Reaktion wurde durch einmaliges Waschen in H_2O abgestoppt. Anschließend wurden durch Aufkochen der Schnitte in Zitratpuffer die Antigene demaskiert. Dieser Schritt ist optional, bietet sich allerdings besonders an, wenn nukleäre Proteine detektiert werden sollen. Vor der Blockierung unspezifischer Bindungen in 10%igen Ziegenserum für 30min wurden die Schnitte dreimal in 1x PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte in spezieller Verdünnung in Ziegenserum bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen in 1x PBS erfolgte die Inkubation mit dem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper (1:500 in Ziegenserum) für 30min bei RT. Nach dreimaligem Waschen in 1x PBS wurden die Schnitte mit einem Streptavidin-HRP-Komplex 30min bei RT inkubiert. Ungebundenes Streptavidin wurde durch 3maliges Waschen in 1x PBS entfernt. Die Substratreaktion erfolgte durch Zugabe von Aminoethylcarbazol (AEC) nach den Angaben des Herstellers (Invitrogen) . Nach einer sichtbaren Ausbildung der roten Färbung wurde die Reaktion durch einen Waschschritt in H_2O abgestoppt. Zur Gegenfärbung der Kerne wurden die Präparate kurz in Hämatoxylin-Gebrauchslösung getaucht und anschließend nach Zugabe von Mowiol eingedeckelt.

Bei Verwendung HRP-gekoppelter Sekundärantikörper wurde die Inkubation mit dem Streptavidin-HRP-Komplex unterlassen.

3.5.3.2 Immunfluoreszenz

Soweit notwendig wurden die Antigene durch Kochen in Zitratpuffer demaskiert, die Schnitte in Ziegenserum blockiert und über Nacht bei 4°C in Primärantikörper(n) inkubiert (siehe Abschnitt 3.5.3.1). Die Inkubation mit Sekundärantikörper(n) erfolgte in 3%igem BSA für 1h bei RT

möglichst im Dunkeln. Anschließend wurden die Schnitte viermal für je 5min in 1x PBS gewaschen, wobei während des ersten Waschschritts eine zusätzliche Kernfärbung mit Hoechst (1:10.000 in PBS) erfolgte. Anschließend wurden die Schnitte in Mowiol eingedeckelt.

3.5.4 TUNEL-Färbung von Paraffinschnitten

Die histologische Detektion apoptotischer Zellen wurde mit dem ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit der Firma Millipore durchgeführt. Die Angaben des Herstellers wurden befolgt.

4 Ergebnisse

4.1 Die Rolle der HectH9/Mcl1-Interaktion bei der Vermittlung der Myc-induzierten Apoptose

4.1.1 Charakterisierung eines geeigneten Zellsystems

Zur Untersuchung der Myc-induzierten Apoptose im Zellkulturexperiment wurde das Zellsystem der U2OSMycER verwendet. Dabei handelt es sich um eine humane Osteosarkoma Zelllinie (U2OS), die stabil mit einem MycER-Fusionsprotein infiziert worden ist. Dies führt zu einer konstitutiven Expression des Proteins, das allerdings durch Interaktion mit dem Hitzeschockprotein Hsp90 im inaktiven Zustand gehalten wird. Die Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) leitet eine Konformationsänderung am murinen Östrogenrezeptor (*estrogen receptor*, ER) ein, durch die das Fusionsprotein aktiviert wird (Eilers *et al.*, 1989). Ein Aminosäureaustausch (G525R) innerhalb der Region des Östrogenrezeptors verhindert die Bindung der im Serum vorkommenden Steroide (Littlewood *et al.*, 1995).

Zur besseren Vergleichbarkeit der Versuche wurde ein Klon der MycER-exprimierenden Zellen etabliert. Vor der Aktivierung von exogenem Myc durch Zugabe von 4-OHT wurden die Zellen in Hungermedium (0,05% Serum) kultiviert um einerseits deren Zellzyklus zu synchronisieren und um andererseits die Expression des endogenen Myc-Proteins zu minimieren. Die Aktivierung von Myc resultierte innerhalb der ersten 24h zunächst in einem Anstieg der Proliferationsrate der Zellen und konnte durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (Abb.4.1A). Bei andauernder Kultivierung der Zellen in OHT-haltigem Hungermedium wiesen die Zellen einen durch Myc vermittelten Anstieg der Apoptoserate auf. Die durch Apoptose eingeleitete Fragmentierung der DNA konnte mittels einer Propidiumiodid (PI)-Färbung durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (Abb.4.1B).

Als Kennzeichen vieler bekannter apoptotischer Signalwege auf proteinbiochemischer Ebene gilt die Spaltung von Parp1. Parp1 ist ein an DNA-bindendes Zink-Finger-Protein, das an Prozessen wie DNA-Reparatur, DNA-Replikation und Chromatin-Modulation beteiligt ist. Nach der Aktivierung von Kaspase3 spaltet diese Parp1, welches daraufhin in das Zytoplasma transloziert und daraufhin seine Wirkung an der DNA verliert.

Auch im Laufe der Myc-induzierten Apoptose wird Parp1 gespalten. Dies ermöglichte es, den Verlauf der Apoptose im Immunoblot sichtbar zu machen (Abb.4.1D). Ebenso konnte die Parp1-

Spaltung mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden (Abb.4.1C). Bereits 48h nach MycER-Aktivierung konnten einige Zellen mit einem Parp1-spezifischen Antikörper angefärbt werden. Die grüne Fluoreszenzfärbung kolokalisierte mit der Hoechst-Kernfärbung.

Die zytobiologische und biochemische Methode der Apoptosedetektion konnten einen Aufschluss darüber geben, in welchem Zeitrahmen etwaige Änderungen der Apoptoserate untersucht werden können.

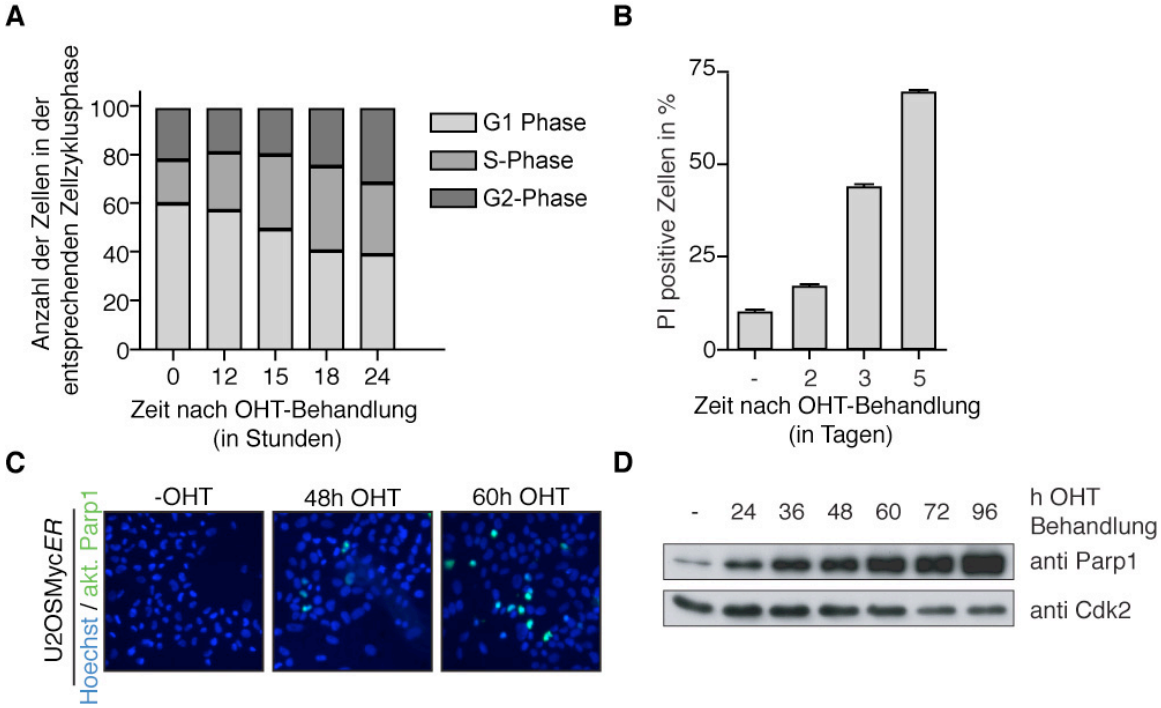


Abbildung 4.1: Myc-induzierte Apoptose im U2OSMycER Zellsystem
U2OSMycER Zellen wurden 2 Tage gehungert und anschließend das Fusionsprotein MycER durch Zugabe von 4-OHT zum Medium aktiviert. (A) Die Veränderung des Zellzyklusprofils nach Aktivierung von Myc wurde durchflusszytometrisch bestimmt (B) In der durchflusszytometrischen Messung wurde der Anstieg der durch die Aktivierung von Myc bedingten Apoptose anhand der Defragmentierung der DNA mittels PI-Inkorporation über einen Zeitraum von 5 Tagen gemessen. Fehlerbalken beruhen auf technischen Replikas. (C) Dokumentation der Myc-induzierten Apoptose. Die Spaltung und Aktivierung von Parp1 konnte als Marker für den apoptotischen Signalweg sowohl im Immunoblot als auch in der Immunfluoreszenz (grün; Alexa-488-konjugierter Sekundärantikörper) nachgewiesen werden (D). Cdk2 diente als Ladekontrolle. Hoechst (blau) wurde zur Kerngegenfärbung verwendet.

4.1.2 Merkmale der Myc-induzierten Apoptose

Der Tumorsuppressor p53 spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Apoptosesignalwegen. Durch die Aktivierung von p53 werden dessen Zielgene Bax, Puma und Noxa induziert und leiten dadurch den extrinsischen Weg der Apoptose ein. Um zu ermitteln, ob diese Zielgene auch bei der Myc-induzierten Apoptose eine Rolle spielen, wurde ein Zeitverlaufsexperiment über 84h nach MycER-Aktivierung vorgenommen. Die Auswertung der quantitativen *real-time* PCR (qPCR) ergab keine Regulation der p53-Zielgene *BAX* und *PMAIP1* auf transkriptioneller Ebene. Die Expression von *BBC3* erhöhte sich abhängig von der Myc-Induktion auf das 4-fache (Abb.4.2A).

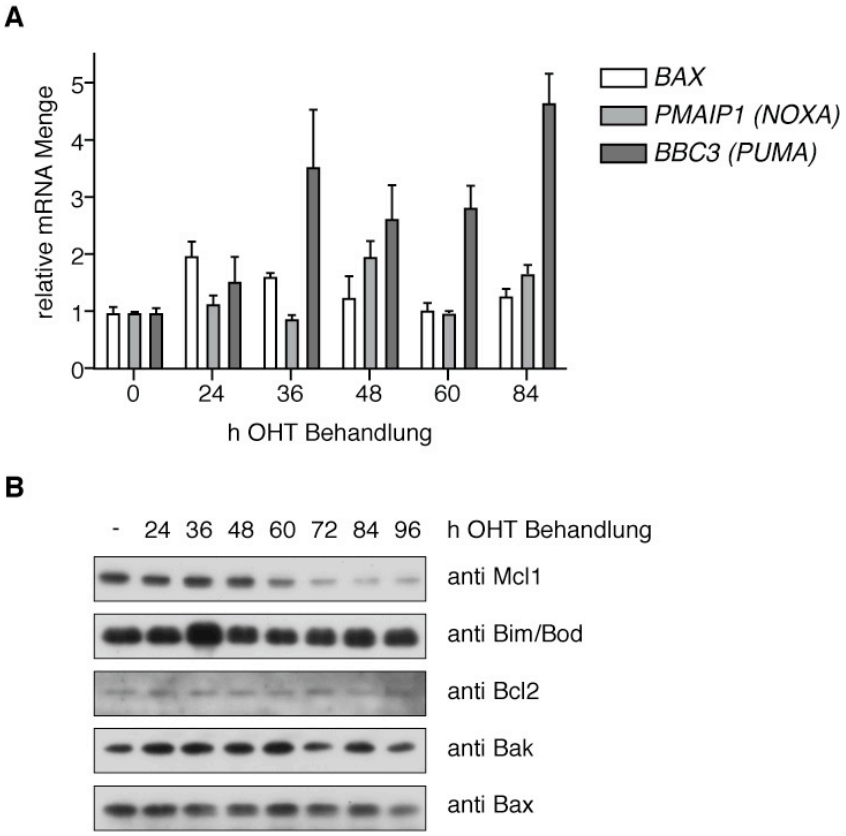


Abbildung 4.2: Charakterisierung der Myc-induzierten Apoptose auf mRNA- und Proteinebene
U2OSMycER Zellen wurden 2 Tage in Hungermedium kultiviert und anschließend das Fusionsprotein MycER durch Zugabe von 4-OHT zum Hungermedium aktiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und mittels Immunoblot und qPCR analysiert. (A) Relative mRNA-Menge von p53-Zielgenen nach MycER Aktivierung. Die Werte wurden auf die Expression des Haushaltsgens Beta-2-Mikroglobulin normalisiert und auf die unbehandelte Probe zum Zeitpunkt 0 eingestellt. (B) Untersuchung der Proteinexpression einiger relevanter Regulatoren der Apoptose nach Aktivierung von MycER in einem Zeitverlaufsexperiment.

Weitere Regulatoren der mitochondrialen Apoptose wurden auf Proteinebene charakterisiert.

Übereinstimmend mit den RNA-Daten zeigte sich auch auf Proteinebene keine Veränderung der Bax-Menge. Die proapoptotischen Proteine Bim/Bod und Bak zeigten ebenfalls keinerlei Veränderung des Expressionslevels über einen Zeitverlauf von 96h. Die beschriebene Myc-abhängige Regulation des proapoptotischen Proteins Bcl2 konnte im Immunoblot nicht nachgewiesen werden. Das mitochondriale Protein Mcl1 wies eine klare Abnahme auf Proteinebene auf. Bereits 60h nach Aktivierung von Myc sank die Proteinmenge um 50%, nach 84h war das Protein im Immunoblot kaum noch zu detektieren (Abb.4.2B).

Die Daten deuten darauf hin, dass Mcl1 eine Rolle in der Myc-induzierten Apoptose spielt.

4.1.3 Die Mcl1 Abnahme ist unabhängig von der Transkription und deutet auf proteasomale Degradation hin.

Um zu testen, ob die Regulierung von Mcl1 auf transkriptioneller oder posttranskriptioneller Ebene stattfindet, wurde die RNA-Menge von *MCL1* in einem Zeitverlaufsexperiment nach Myc-Aktivierung bestimmt. Die Auswertung der qPCR zeigt, dass die Mcl1 Expression unabhängig von dessen Transkription reguliert wurde, da sich die mRNA-Menge eher erhöhte als erniedrigte (Abb.4.3A).

Um zu untersuchen, ob die Regulation auf einem posttranskriptionellen Mechanismus beruht, wurde ein MG-132-Zeitverlaufsexperiment in U2OS Zellen durchgeführt. Ein Teil der Zellen wurde mit dem Proteasominhibitor MG-132 vorinkubiert. Da MG-132 bei längerer Inkubation durch die Aktivierung der c-Jun Kinase Apoptose einleitet (Meriin *et al.*, 1998), wurde für diesen Versuch UVB als Apoptose-induzierende Substanz verwendet, um die Dauer des Zeitverlaufs auf 6h zu reduzieren. Dabei wurden die Zellen mit UVB bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung geerntet.

In den unbehandelten Zellen führte die Bestrahlung mit UVB vergleichbar zur Aktivierung von MycER zu einer Abnahme des Mcl1-Proteinlevels (vgl. Abb.4.2B und 4.3B). Durch die Inkubation mit MG-132 wurde das Proteinlevel konstant gehalten und der Abbau von Mcl1 konnte vollkommen inhibiert werden.

Da der Nachweis einer Abnahme der *MCL1* mRNA-Menge ausblieb, die Degradation des Mcl1 Proteinlevels zumindest nach UVB abhängig vom Proteasom war, deutet dies darauf hin, dass Mcl1 posttranskriptional modifiziert und davon ausgehend degradiert wird.

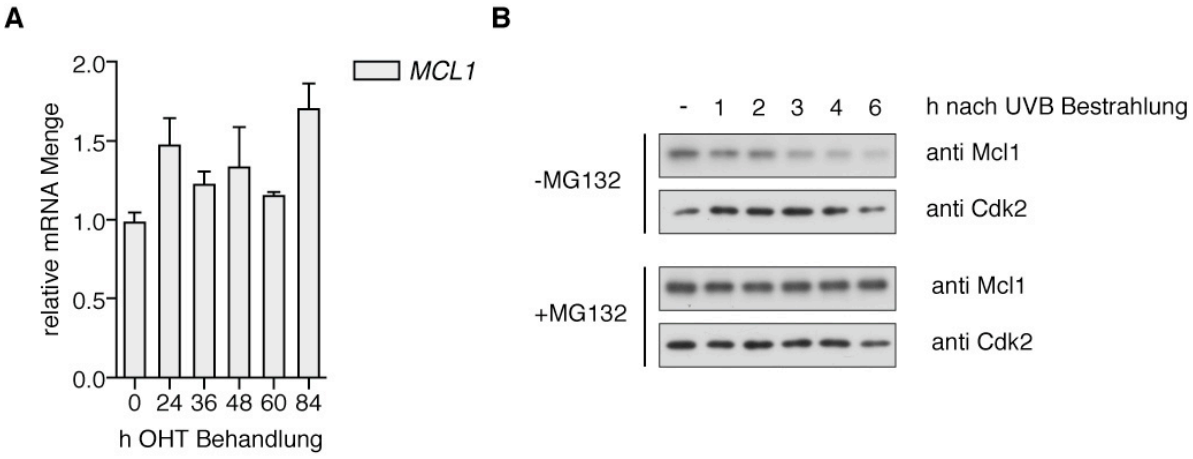


Abbildung 4.3: Regulation des antiapoptotischen Proteins Mcl1 auf mRNA- und Proteinebene
(A) U2OSMycER Zellen wurden gehungert und die Aktivität von MycER durch Zugabe von 4-OHT erhöht. Die mRNA-Mengen von *MCL1* wurden im Zeitverlaufsexperiment zu den angegebenen Zeitpunkten nach MycER-Aktivierung analysiert. Die Werte wurden auf Beta-2-Mikroglobulin normalisiert und relativ zur unbehandelten Probe dargestellt. (B) Unbehandelte oder mit 4µmol MG-132 vorbehandelte U2OS Zellen wurden 1min mit UVB bestrahlt und die Expression von Mcl1 zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung auf Proteinebene untersucht. Cdk2 diente als Ladekontrolle.

In gesunden, unbehandelten Zellen assoziiert Mcl1 an der Mitochondrienmembran mit dem proapoptotischen Protein Bak. Wird die Apoptose eingeleitet, wird Mcl1 aus dem Komplex entfernt, was zu einer Homodimerisierung von Bak- oder Heterodimerisierung von Bak/Bax-Proteinen führt. Die dadurch gebildete Pore in der Mitochondrienmembran begünstigt den Austritt von Zytochrom C in das Zytoplasma. Der im unbehandelten Zustand durch Mcl1 maskierte Aminoterminus des Bak-Proteins wird dabei zum Zytoplasma hin exponiert (Nieminen *et al.*, 2007).

Durch immunzytochemische Analysen konnte der aktivierte Zustand von Bak 60h nach 4-OHT Zugabe sichtbar gemacht werden. Der exponierte N-Terminus wurde anhand eines Antikörpers, der spezifisch gegen dieses Epitop gerichtet ist, detektiert und konnte im Fluoreszenzmikroskop anhand der grünen, zytoplasmatischen Färbung visualisiert werden. In unbehandelten Zellen blieb die spezifische Färbung mit dem Bak Antikörper aus (Abb.4.4A).

Um die Rolle von Mcl1 in der Myc-induzierten Apoptose zu untersuchen, wurden *short-hairpin* RNAs (*sh*RNA) kloniert. Diese wurden eingesetzt, um die Expression des endogenen Mcl1-Proteins herunterzuregulieren (Abb.4.4B, rechte Teilabbildung). Nach stabiler Infektion der U2OSMycER Zellen mit der *sh*RNA oder einem Kontrollplasmid, konnte die Herunterregulation der Mcl1 Expression auf Proteinebene dokumentiert werden. Die mit *MCL1*-*sh*RNA infizierten Zellen wurden zusammen mit Kontroll-*sh*RNA infizierten Zellen einer Apoptose-Untersuchung unterzogen. Die Auswertung der PI-Inkorporation mittels Durchflusszytometrie zeigte einen

deutlichen Anstieg der Apoptoserate um 20% in den *MCL1*-defizienten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb.4.4B, linke Teilabbildung). Dieses Ergebnis konnte mit Hilfe einer zweiten gegen *MCL1*-gerichteten *sh*RNA, die allerdings den Proteingehalt mit schwächerer Effizienz verminderte, bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Somit konnte die Wahrscheinlichkeit sequenzunspezifischer Nebeneffekte (*off-target-effect*) der *sh*RNAs vermindert werden.

Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass Mcl1, solange es in der Mitochondrienmembran lokalisiert ist, Bak in einem inaktiven Zustand hält, der die Zellen vor Apoptose schützt. Sobald Mcl1 durch Degradation oder Depletion aus dem Komplex entfernt wird weisen die Zellen eine erhöhte Anfälligkeit zur Apoptose auf.

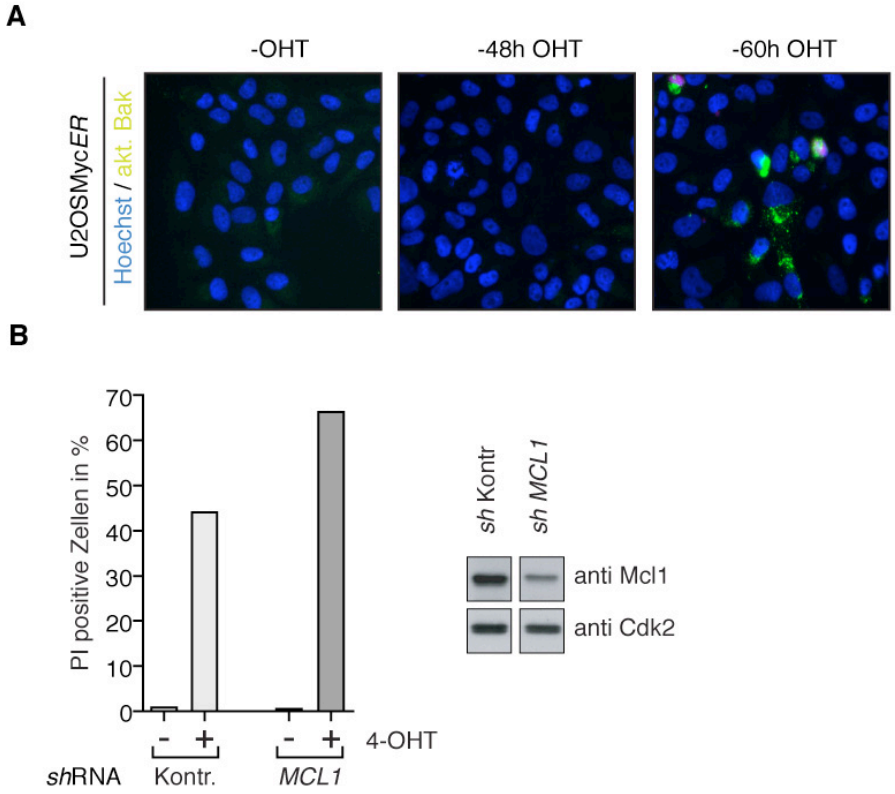


Abbildung 4.4: Die Relevanz von Mcl1 in der Myc-induzierten Apoptose
(A) U2OSMycER Zellen wurden in Mangelmedium kultiviert und MycER durch Zugabe von 4-OHT aktiviert. Die Zellen wurden in der Immunfluoreszenz auf die Aktivierung von Bak mit einem spezifischen Antikörper (grün, sekundär Antikörper Alexa-488-konjugiert) untersucht. Hoechst (blau) diente zur Kerngegenfärbung. (B) U2OSMycER Zellen wurden mit einem Kontrollplasmid oder einer gegen *MCL1* gerichteten *sh*RNA infiziert und deren Einfluss auf die Myc-induzierte Apoptose untersucht. Das Apoptoselevel nach 5 Tagen 4-OHT-Behandlung wurde im Durchflusszytometer bestimmt. (C) Der Immunoblot dokumentiert die durch *sh*RNA bedingte Abnahme des Mcl1-Proteins. Cdk2 diente als Ladekontrolle.

4.1.4 Die Depletion von *HECTH9* vermindert die Myc-induzierte Apoptose

Das Protein HectH9 wurde 2005 als E3-Ligase von Mcl1 beschrieben (Zhong *et al.*, 2005). Um den Einfluss von HectH9 auf die Myc-induzierte Apoptose zu untersuchen, wurden *HECTH9*-spezifische *sh*RNAs verwendet. Abbildung 4.5B zeigen die verminderte Expression von HectH9 nach dessen Depletion auf mRNA- sowie auf Proteinebene im Vergleich zu Kontroll-*sh*RNA infizierten Zellen.

Die Veränderung der Apoptose durch den Einfluss der *HECTH9*-*sh*RNA im Vergleich zur Kontroll-*sh*RNA wurde unter Zuhilfenahme verschiedener Techniken untersucht. Bereits lichtmikroskopisch waren die Unterschiede, die 5 Tage nach MycER-Aktivierung auftraten, deutlich erkennbar (Abb.4.5D). Die Kontrollzellen lösten sich auf Grund von Apoptose von der Wachstumsunterlage ab und schwammen abgekugelt im Zellmedium. Die *HECTH9*-defizienten Zellen waren bis auf wenige als konfluenter Rasen an der Wachstumsunterlage angeheftet und zeigten kaum morphologische Merkmale von Apoptose. In der durchflusszytometrischen Bestimmung der Kaspase3-Aktivität bestätigte sich diese Beobachtung (Abb.4.5A). Im Vergleich zu den Kontrollzellen wiesen die *HECTH9*-*sh*RNA infizierten Zellen eine Verminderung der Kaspaseaktivität um etwa 50% auf. Zur weiteren Bestätigung dieser Ergebnisse wurde ebenfalls die PI-Inkorporation durchflusszytometrisch bestimmt (Abb.4.5C). Um Nebeneffekte auszuschließen, wurde eine weitere *sh*RNA gegen endogenes *HECTH9* verwendet (*HECTH9-shRNA* IV). Ebenfalls durch PI-Inkorporation konnte bestätigt werden, dass die Zahl apoptotischer Zellen abhängig von der Infektion einer *HECTH9*-*sh*RNA deutlich reduziert war. Dies galt für zwei unabhängige *sh*RNAs und vermindert die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von sequenzunspezifischen Nebeneffekten.

Auf Proteinebene wurde untersucht, inwieweit die Depletion von *HECTH9* eine Auswirkung auf das Proteinlevel von Mcl1 hatte. Dazu wurden Proteinlysate eines Zeitverlaufsexperiments nach Aktivierung von Myc durch OHT von Kontrollzellen und *HECTH9-shRNA* infizierten Zellen aufgetragen (Abb.4.5E). Die Immunoblotanalyse bestätigt die Ergebnisse aus Abbildung 4.5A, da die *HECTH9*-defizienten Zellen 72h nach OHT-Zugabe eine verminderte Spaltung von Parp1 aufwiesen, was auf eine verminderte Apoptoserate zurückzuführen ist.

Bereits die basale Expression von Mcl1 war in den *HECTH9*-depletierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen stark erhöht. 72h nach Myc-Aktivierung war das Mcl1-Level in den Kontrollzellen nur noch geringfügig detektierbar und das Protein fast vollständig abgebaut. Ausgehend von einer höheren Basalmenge konnte bedingt durch die *HECTH9*-Depletion ein

verminderter Abbau von Mcl1 nachgewiesen werden.

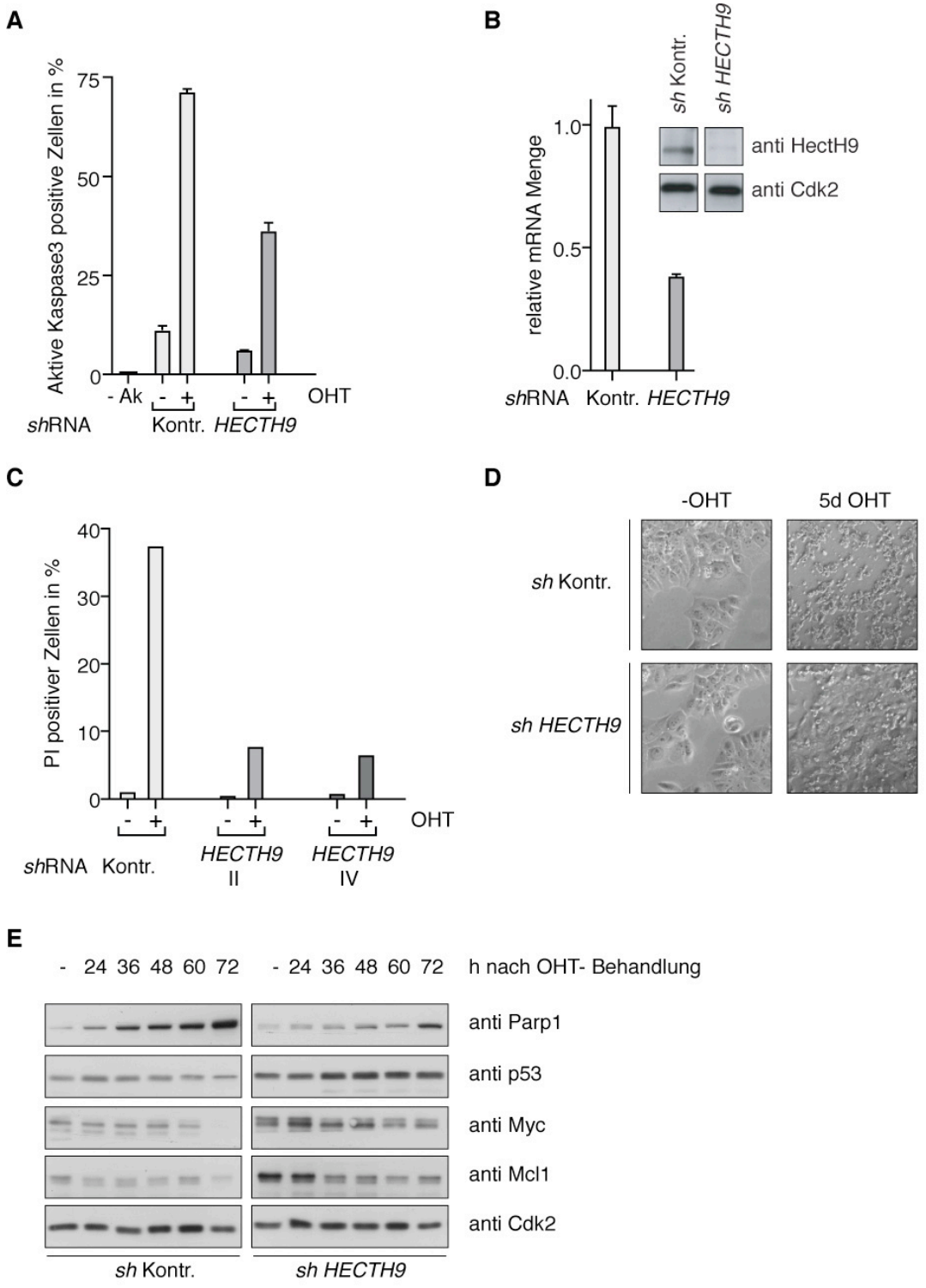


Abbildung 4.5: Die E3 Ubiquitinligase HectH9 beeinflusst die Effizienz der Myc-induzierten Apoptose

U2OSMycER Zellen wurden mit *sh*RNAs stabil infiziert, in Mangelmedium kultiviert und MycER durch Zugabe von 4-OHT zum Medium aktiviert. (A) Kontrollinfizierte und *HECTH9-sh*RNA infizierte Zellen

wurden einer Apoptose-Untersuchung unterzogen und die Aktivität von Kaspase3 in unbehandelten und in für 5 Tage mit 4-OHT behandelten Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Es wurde eine Färbung ohne Antikörper (Nagahara *et al.*) zur Kontrolle durchgeführt. Fehlerbalken beruhen auf technischen Replika. (B) Dokumentation der Depletion von HectH9 auf mRNA-Ebene (links) und Proteinebene (rechts). (C) Zellen wurden mit einem Kontrollplasmid oder mit einer gegen *HECTH9* gerichteten *sh*RNA (#II oder #IV) infiziert und der Anteil apoptotischer Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. (D) Mikroskopische Aufnahmen von Kontrollzellen und *HECTH9*-depletierten Zellen dokumentieren das Auftreten von Apoptose. (E) Mittels Immunoblot wurde die Expression von Proteinen in Abhängigkeit der Aktivierung von Myc in Kontrollzellen und *HECTH9*-depletierten Zellen in einem Zeitverlaufsexperiment verglichen. Cdk2 diente als Ladekontrolle.

Weiterhin wurden ebenfalls die bekannten HectH9 Substrate c-Myc und p53 untersucht. Die Menge von p53 war in den *HECTH9*-defizienten Zellen erhöht, blieb aber, vergleichbar mit den Kontrollzellen, über den Zeitverlauf des Versuchs unverändert. Die Menge von Myc war gegenüber den Kontrollzellen in den *HECTH9*-*sh*RNA infizierten Zellen ebenfalls erhöht und nahm über den Zeitverlauf hinweg ab.

Um die Kooperativität zwischen HectH9 und Mcl1 in der Myc-induzierten Apoptose zu untersuchen, wurde eine Kodepletion beider Proteine vorgenommen. Dazu wurden U2OSMycER Zellen zunächst mit einer gegen *HECTH9* gerichteten *sh*RNA infiziert und selektioniert und dies anschließend mit einer gegen *MCL1* gerichteten *sh*RNA wiederholt. Die Apoptoserate dieser Zellen wurde anhand der PI-Inkorporation durchflusszytometrisch bestimmt (Abb.4.6).

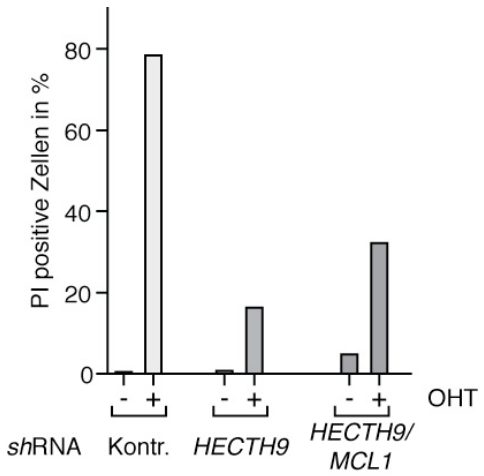


Abbildung 4.6: Die Kodepletion von *HECTH9* und *MCL1* erhöht das Level apoptotischer Zellen im Vergleich zur einfachen HectH9-Depletion
U2OSMycER wurden mit einem Kontrollplasmid, mit *HECTH9*-*sh*RNA oder einer Kombination von *HECTH9*-*sh*RNA und *MCL1*-*sh*RNA stabil infiziert und das Auftreten apoptotischer Zellen 5 Tage nach Behandlung mit 4-OHT im Durchflusszytometer ermittelt.

Einfach-depletierte Zellen für *HECTH9* und Kontroll-*sh*RNA infizierte Zellen dienten hierbei als Kontrolle. Wie bereits gezeigt werden konnte resultiert die Einfachdepletion von *HECTH9* in einer Reduktion der Apoptoserate von 80% auf 20% gegenüber den Kontrollzellen. Die

Kodepletion von *MCL1* erhöhte die Apoptoserate der *HECTH9*-defizienten Zellen auf annähernd 40%. Dies gibt Aufschluss darüber, dass die Reduktion der Apoptose, die durch Depletion von *HECTH9* erreicht werden konnte, von Mcl1 abhing. Somit zeigte sich, dass die gleichzeitige Verminderung von HectH9 und Mcl1 in der Myc-induzierten Apoptose einen antagonistischen Effekt aufeinander ausüben konnte.

4.1.5 HectH9 ubiquitiniert Mcl1 *in vivo*

Zur weiteren Analyse der Kooperation von HectH9 und Mcl1 wurde eine *in vivo* Ubiquitinierungs-Untersuchung durchgeführt. Dazu wurden HeLa Zellen mit Expressionsplasmiden für Mcl1 und Histidin-markiertem Ubiquitin (His-Ubi) transfiziert. In steigenden Mengen (10 und 15µg) wurde ein Plasmid, das für HectH9 codiert, kotransfiziert. Da HectH9 in voller Länge nicht exogen exprimiert werden kann wurde ein Expressionsplasmid verwendet, das für eine N-terminal verkürzte Form des Proteins codiert (ΔN-HectH9). Durch Inkubation der Proteinlysate mit einer Kobalt-gekoppelten Agarose-Matrix (TALON® Superflow, Clontech) wurden die His-Ubi-markierten Proteine aus dem Lysat präzipitiert. Das Eluat der Präzipitation wurde zusammen mit den Inputproben im Immunoblot analysiert. Wie Abbildung 4.7A zeigt, wurde Mcl1 allein durch die Kotransfektion von His-Ubi vermehrt ubiquitiniert. Die Kotransfektion der E3-Ligase HectH9 verstärkte die Modifikation an Mcl1. Die Intensität des Ubiquitinierungsmusters am Substrat hing von der Menge an HectH9 ab, da sie mit zunehmender Menge an E3-Ligase ebenfalls anstieg.

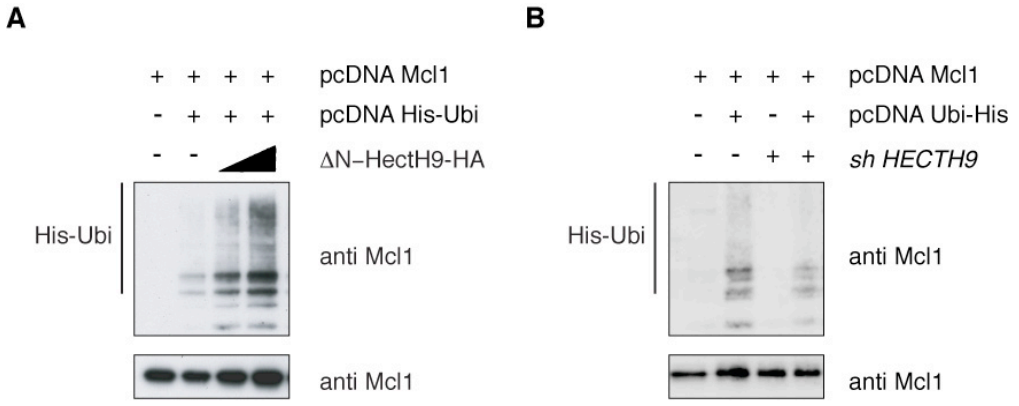


Abbildung 4.7: Mcl1 wird in Abhängigkeit von HectH9 ubiquitiniert.
HeLa Zellen wurden mit den angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert und für 4h mit MG-132 (4 µmol) behandelt. Mit den Lysaten wurde eine *in vivo* Ubiquitinierungs-Untersuchung durchgeführt. Das Eluat wurde im Immunoblot auf die Akkumulation der Ubiquitinierung analysiert. Das nicht aufgereinigte Proteinlysat diente als Ladekontrolle. Modifikation in Abhängigkeit einer Überexpression von HectH9 (A) und nach Depletion von *HECTH9* (B).

Um diese Beobachtung zu bestätigen wurde eine weitere Ubiquitinierungs-Untersuchung

durchgeführt. Dazu wurden HeLa Zellen mit einem Expressionsplasmid für Mcl1 und His-Ubi kotransfiziert. Die Zellen wurden weiterhin mit einem Vektor transfiziert, der das endogene Proteinlevel von HectH9 herunterregulierte (siehe Abb.4.5B). Zum Vergleich wurden Zellen mit einer Kontroll-*sh*RNA transfiziert. Ähnlich wie in Abb.4.7A, konnte in den Kontrollzellen schon die Kotransfektion von His-Ubiquitin das Ubiquitinierungsmuster von Mcl1 unabhängig von der Zugabe exogener E3-Ligasen erhöhen (Abb.4.7B). In Folge der Depletion von *HECTH9* wurde die Intensität der Modifikation an Mcl1 im Vergleich zu den Kontrollzellen reduziert. Dies lässt darauf schließen, dass die Ubiquitinierung von Mcl1 von der Expression von HectH9 abhängig ist.

4.1.6 HectH9 und Mcl1 interagieren sowohl exogen als auch endogen

Bisher konnte gezeigt werden, dass der posttranslationale Abbau von Mcl1 durch HectH9 auf der Ubiquitinierung von Mcl1 beruht. Zur genaueren Untersuchung der Stabilisierung von Mcl1 durch HectH9 wurde untersucht, ob beide Proteine direkt miteinander interagieren können. Dazu wurden Immunpräzipitationsversuche durchgeführt.

Zunächst wurden HeLa Zellen mit Expressionsplasmiden für Mcl1 und für eine verkürzte Form von HectH9 (ΔN-HectH9) transfiziert. Das Lysat wurde aufgeteilt und mit HectH9 und Mcl1 spezifischen Antikörpern präzipitiert. Um ausschließen zu können, dass Proteine unspezifisch an die Ketten der Antikörper binden wurden gleichermaßen Immunpräzipiationen mit Kontrollantikörpern der Spezies Kaninchen und Maus durchgeführt. Im Präzipitat des Mcl1-Antikörpers war ein deutliches Signal von HectH9 erkennbar (Abb.4.8A). Dies galt ebenfalls für das HectH9-Präzipitat, in dem allerdings nur Spuren des Mcl1-Proteins nachgewiesen wurden. Dadurch konnte auf eine direkte physikalische Interaktion der beiden exogenen Proteine geschlossen werden.

Um eine artifizielle Interaktion, die aus der Überexpression zweier Proteine resultiert, ausschließen zu können, wurde ebenfalls eine Immunpräzipitation der endogenen Proteine in HeLa Zellen durchgeführt. Ein Teil der Zellen wurde mit UVB behandelt und die erfolgreiche Aktivierung der DNA-Schadensantwort anhand der Analyse des Phosphorylierungsstatus von Atm und Chk1 dokumentiert (Abb.4.8B, linke Teilabbildung). Zunächst wurden die mit UVB behandelten und die unbehandelten Zelllysate mit einem Mcl1 spezifischen Antikörper präzipitiert. Anschließend wurde die Menge an im Mcl1-Präzipitat enthaltenen HectH9-Protein im Immunoblot dokumentiert. Die Intensität der Banden blieb nach Behandlung mit UVB annähernd gleich, war allerdings in der Kontroll-IP nicht zu sehen, und deutet daher auf eine

spezifische Interaktion beider endogener Proteine (Abb.4.8B, rechte Teilabbildung).

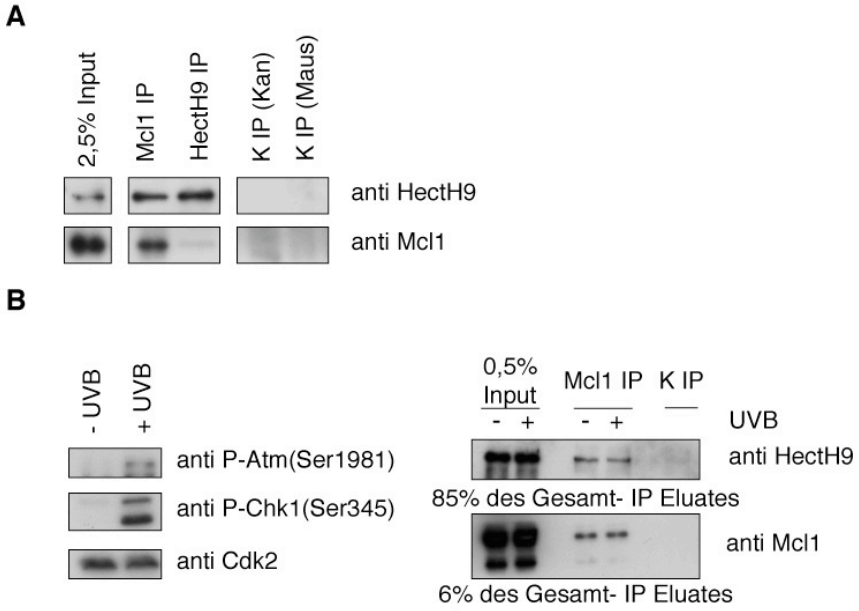


Abbildung 4.8: HectH9 und Mcl1 interagieren direkt miteinander
(A) HeLa Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für Mcl1 und HectH9 (ΔN-HectH9) transfiziert und vor der Ernte für 4h mit MG-132 inkubiert. Das Zelllysat wurde aufgeteilt, mit HectH9- und Mcl1-Antikörpern sowie den Kontrollantikörpern der entsprechenden Spezies Maus und Kaninchen (Kan) präzipitiert und im Immunoblot analysiert. Zum Vergleich wurden 2,5% des Inputs aufgetragen. Für den Mcl1 Immunoblot wurden von der Mcl1-IP nur 25% aufgetragen. (B) HeLa Zellen wurden mit UVB behandelt und nach einer Stunde geerntet. Die Proteinlysate wurde mit Mcl1-spezifischem Antikörper und Kontrollantikörper inkubiert und das Eluat im Immunoblot analysiert. Zum Vergleich wurden 0,5% des Inputs aufgetragen. Zur Dokumentation des durch UVB ausgelösten DNA-Schadens wurde nicht-präzipitiertes Lysat verwendet. Als Ladekontrolle diente Cdk2.

4.1.7 Lysin-freies Mcl1 wird stabilisiert und schützt vor Myc-induzierter Apoptose

Zhong und Kollegen etablierten eine Mutante von Mcl1, in der alle 13 Lysine zu Arginin mutiert wurden (Mcl1-mut) (Zhong *et al.*, 2005). *In vitro* kann diese Mutante von HectH9 nicht mehr ubiquitiniert werden. Um diese Ergebnisse *in vivo* zu bestätigen, wurde eine Ubiquitinierungs-Untersuchung mit Mcl1-wt und Mcl1-mut als Substrate durchgeführt. Wie bereits in Abbildung 4.7A gezeigt wurde, resultierte die Expression der ΔN-Mutante von HectH9 in einer Verstärkung im Ubiquitinierungsmuster an Mcl1-wt. Im Gegensatz dazu verschwand die durch HectH9 induzierte Modifikation völlig wenn die mutierte Form von Mcl1 als Substrat eingesetzt wurde (Abb.4.9). Eine Ubiquitinierung durch endogene Faktoren konnte an Mcl1-mut ebenso wenig nachgewiesen werden (Abb.4.9. Spur3 im Vergleich zu Spur1).

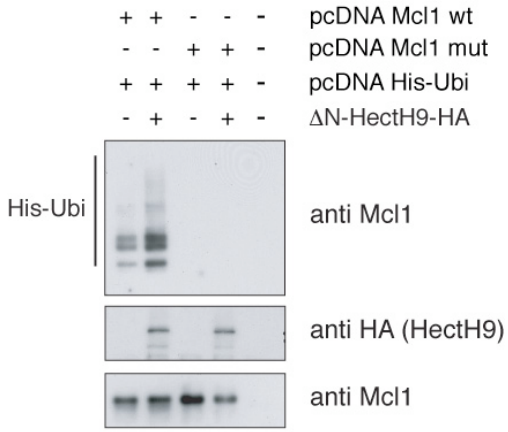


Abbildung 4.9: HectH9 ist in der Lage Mcl1-wt zu ubiquitinieren, nicht aber eine Lysin-freie Mutante
HeLa Zellen wurden mit den angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert und für 4h mit MG-132 (4µmol) behandelt. Nach Durchführung einer *in vivo* Ubiquitinierungs-Untersuchung wurden die Eluate im Immunoblot auf die Akkumulation von Ubiquitin analysiert. Das nicht aufgereinigte Proteinlysat diente als Ladekontrolle.

Um zu untersuchen, inwieweit die Überexpression von Mcl1-wt und der Mutante die Myc-induzierte Apoptose beeinflussten, wurden ausgehend von U2OSMycER Zelllinien hergestellt, die stabil mit den Mcl1 Konstrukten, sowie einem Leervektor als Kontrolle, infiziert wurden. Obwohl Mcl1-wt auf RNA Ebene stärker exprimiert wurde (Abb.4.10, linke Teilabbildung), konnte auf Proteinebene ein stärkeres Signal der Mcl1-Mutante nachgewiesen werden (Abb.4.10, rechte Teilabbildung). Dies deutet auf eine gesteigerte Stabilisierung durch einen Defekt im Abbau der Mutante hin.

Die Untersuchung der Apoptose konnte zeigen, dass Zellen, die Mcl1-mut exprimierten vor Myc-induzierter Apoptose geschützt waren (Abb.4.10B). Auch 5 Tage nach Aktivierung von MycER beschränkte sich der Prozentsatz apoptotischer Zellen auf einen Wert von unter 10%, wohingegen dieser in Kontrollzellen, sowie in Zellen die Mcl1-wt exprimieren, schon auf über 30% angestiegen war. Lichtmikroskopische Aufnahmen bestätigten dieses Ergebnis (Abb.4.10C). Auf Proteinebene wurde deutlich, dass mutiertes Mcl1 nach Induktion von MycER im Zeitverlaufsexperiment akkumulierte. Im Gegensatz dazu konnte wt Mcl1 die Zellen nicht vor Apoptose schützen, da es, trotz erhöhter Basalmengen im Vergleich zu den Kontrollzellen, weiterhin abgebaut wurde (Abb.4.10D).

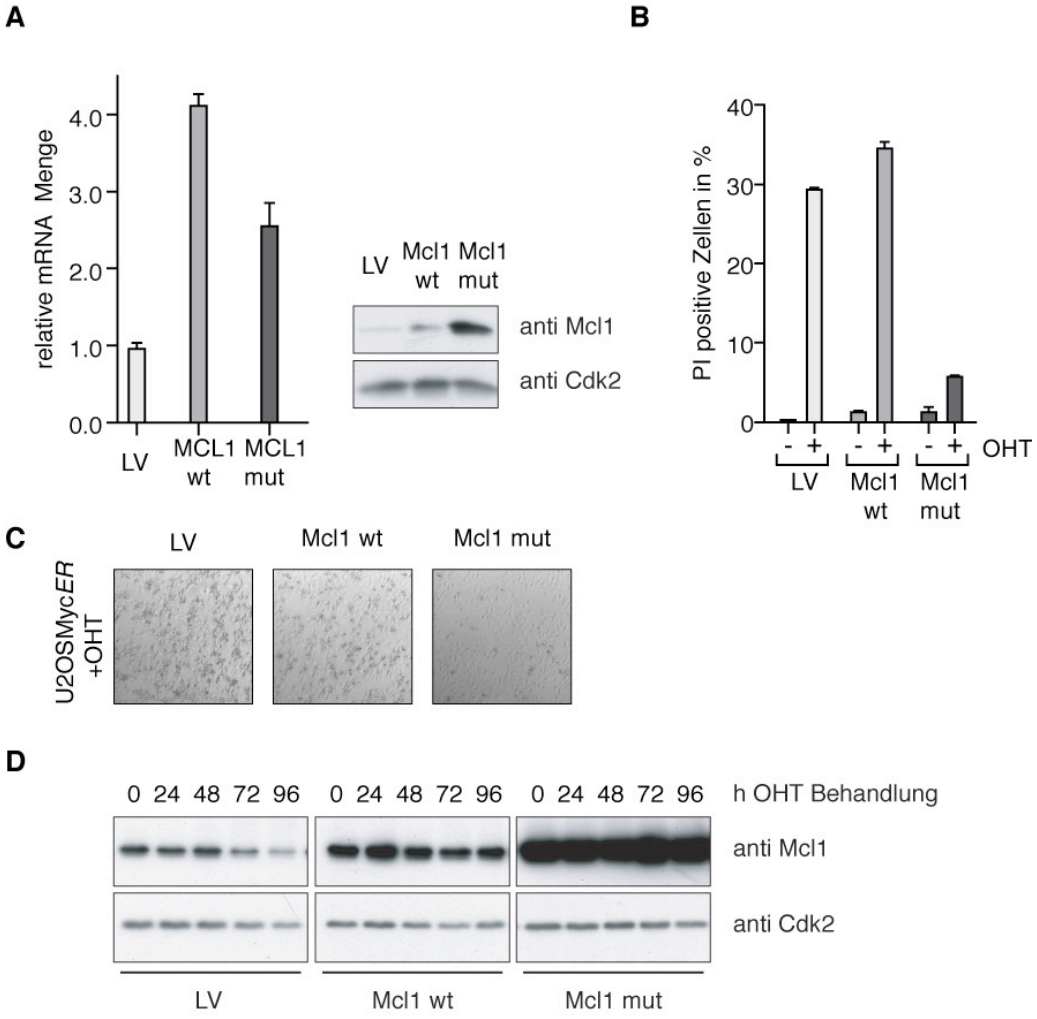


Abbildung 4.10: Die Lysin-freie Mutante von Mcl1 reduziert das Level der Myc-induzierten Apoptose
U2OSMycER Zellen wurden stabil mit Expressionsplasmiden für den Leervektor, Mcl1-wt und Mcl1-mut infiziert. Nach der Selektion wurde das Level der Myc-induzierten Apoptose bestimmt. (A) Immunoblot (rechts) und qPCR (links) bestätigen die Überexpression der Mcl1-Varianten. Cdk2 diente als Ladekontrolle. Die mRNA wurde auf die Werte von Beta-2-Mikroglobulin normalisiert und relativ zu dem Kontrollvektor aufgetragen. (B) Die von der Apoptose abhängige Defragmentierung der DNA wurde durchflusszytometrisch 5 Tage nach Aktivierung von MycER gemessen. Fehlerbalken beruhen auf technischen Replika. (C) Im Lichtmikroskop wurde der Unterschied im Level der Apoptose mikroskopisch sichtbar gemacht. (D) Der Immunoblot dokumentiert die Regulation von Mcl1 auf Proteinebene. Cdk2 diente als Ladekontrolle.

4.1.8 Die Aktivierung von Myc induziert die DNA-Schadensantwort

Myc besitzt die Fähigkeit, durch die Stimulation der Replikation Schaden an der DNA zu induzieren (Dominguez-Sola *et al.*, 2007). In einem Zeitverlaufsexperiment wurde getestet, inwieweit die Schadensantwort auch im Zellsystem der U2OSMycER ausgelöst werden kann. Dazu wurde MycER durch Zugabe von 4-OHT aktiviert und die Zellen zu den angegebenen

Zeitpunkten geerntet und auf Proteinebene analysiert. Der deutlicher Anstieg der Phosphorylierung des Serin 139 an der Histonvariante H2A.X war auf eine zelluläre DNA-Schadensantwort zurückzuführen (Abb.4.11). Der Zeitpunkt der Modifikation an H2A.X korreliert mit dem durch Myc verursachten Anstieg der Proliferation (Abb.4.1A).

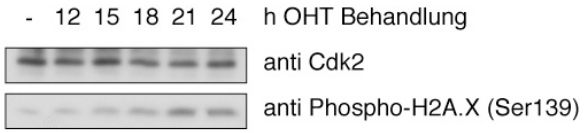


Abbildung 4.11: Nach Aktivierung von MycER steigt die Phosphorylierung von H2A.X an
U2OSMycER wurden über einen Zeitraum von 24h mit 4-OHT behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten im Immunoblot untersucht. Cdk2 diente als Ladekontrolle.

4.1.9 Das Maß der Ubiquitinierung von Mcl1 nimmt nach DNA-Schaden zu

Untersuchungen zur Interaktion von Mcl1 und HectH9 (Abb.4.8B) konnten keine Zunahme der Wechselwirkung beider Proteine nach DNA-Schaden (vermittelt durch UVB) zeigen. Es stellte sich allerdings die Frage, ob die Ubiquitinierung von Mcl1 nach DNA-Schaden zunimmt um dadurch zum beschleunigten Abbau von Mcl1 zu führen. Dazu wurden HeLa Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach UVB Behandlung geerntet und auf die Zunahme der Ubiquitinierung an Mcl1 untersucht.

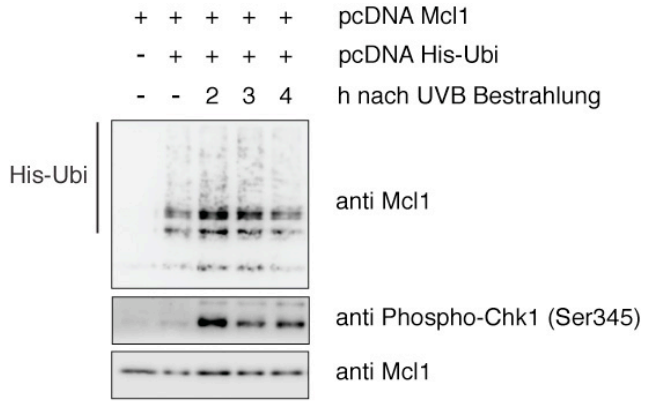


Abbildung 4.12: Mcl1 wird abhängig von DNA-Schaden ubiquitiniert
HeLa Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und ein UVB-Zeitverlaufsexperiment durchgeführt. Die His-Ubiquitin modifizierten Proteine wurden chromatographisch aufgereinigt und im Immunoblot analysiert. Das nicht aufgereinigte Proteinlysat diente als Ladekontrolle und zum Nachweis der Aktivität der DNA-Schadensantwort.

Im Vergleich zum unbehandelten Status der Zellen wurde die Modifikation an Mcl1 2h nach UVB Bestrahlung der Zellen verstärkt (Abb.4.12). Zu diesem Zeitpunkt war auch die Atm/Atr-abhängige Phosphorylierung von Chk1 am intensivsten. Die Akkumulation hielt bis 3h nach

Bestrahlung an und nahm im weiteren Verlauf des Experiments wieder bis auf das Level der unbehandelten Zellen ab.

4.1.10 Die Behandlung mit Koffein vermindert das Level von Myc-induzierter Apoptose

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit die sich Funktion von Myc, DNA-Schaden zu induzieren auf die Apoptoseinduktion auswirkt. Dazu wurden Zellen mit Inhibitoren des DNA-Schadensantwort-Signalweges behandelt.

Koffein inhibiert die katalytische Aktivität von Atm und Atr, die als Sensor und Vermittler von DNA-Schaden beschrieben sind (Sarkaria *et al.*, 1999). U2OSMycER Zellen wurden zunächst mit Koffein präinkubiert, bevor Myc über eine Zeitraum von 5 Tagen aktiviert wurde. Zur permanten Inhibition der DNA-Schadensantwort wurden die Zellen über die Dauer des Versuchs in Koffein-haltigem Medium kultiviert. Zum Abschluss des Experiments wurde eine durchflusszytometrische Bestimmung der Kaspase3-Aktivität durchgeführt. Abbildung 4.13A zeigt eine deutliche Reduktion an apoptotischen Zellen durch die Behandlung mit Koffein verglichen mit den unbehandelten Zellen.

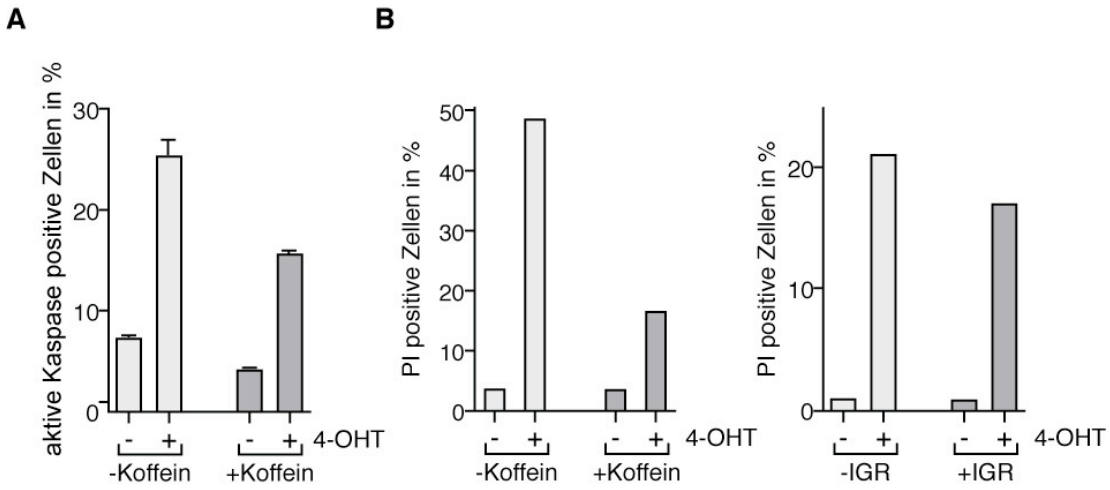


Abbildung 4.13: Die Behandlung mit Koffein hat im Gegensatz zu IGR einen Einfluss auf die Myc-induzierte Apoptose.
U2OSMycER Zellen wurden wie angegeben behandelt und die Expression von MycER für 5 Tage aktiviert. (A) Abhängig von der Behandlung mit 3µmol Koffein wurde die Aktivierung von Kaspase3 durchflusszytometrisch bestimmt. (B) Zum Vergleich der beiden Substanzen Koffein und IGR wurden Zellen vorinkubiert und der Anteil apoptotischer Zellen durchflusszytometrisch ermittelt.

Als weiterer Hemmstoff wurde die Wirkung von Isogranulatimide (IGR) untersucht. Dabei handelt es sich um einen reversiblen Inhibitor der Checkpoint Kinase1 (Chk1), sowie in geringem

Maß der Checkpoint Kinase 2 (Chk2). Im Vergleich zur Anwendung von Koffein zeigte die Inhibition der DNA-Schadensantwortsignalkaskade durch IGR keine Auswirkung auf die Myc-induzierte Apoptose (Abb.4.13B). Während Koffein den Anteil apoptotischer Zellen um 60% reduzierte, blieb die durch IGR vermittelte Hemmung der DNA-Schadenssignalkaskade wirkungslos auf die Myc-induzierte Apoptose.

4.1.11 Durch Anwendung von Koffein wird die Ubiquitinierung von Mcl1 gehemmt und dessen Proteinlevel stabilisiert

Die E3-Ligase HectH9 wurde als Substrat von Atm (oder Atr) identifiziert (Mu *et al.*, 2007). Um zu untersuchen, ob durch Inhibition von Atm/Atr auch die Aktivität von HectH9 beeinträchtigt wird, wurde eine Ubiquitinierungs-Untersuchung an Mcl1 durchgeführt, bei der HeLa Zellen zuvor mit Koffein behandelt wurden. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen, die einen Anstieg der Ubiquitinierung an Mcl1 durch endogene Faktoren aufwiesen, konnte die Zugabe von Koffein die Ubiquitinierung an Mcl1 hemmen(Abb.4.14).

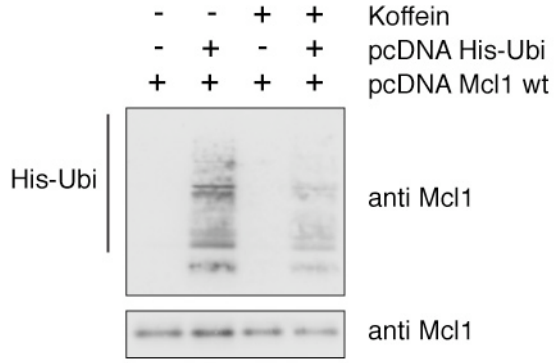


Abbildung 4.14: Die Behandlung mit Koffein schwächt die Bindung zwischen Mcl1 und HectH9 und führt in dessen Konsequenz zu einer verminderten Ubiquitinierung an Mcl1
HeLa wurden mit den angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert und eine Ubiquitinierungs-Untersuchung an unbehandelten und Koffein-behandelten Zellen durchgeführt. Die Modifikation wurde mittels Immunoblot dokumentiert. Nicht aufgereinigtes Lysat diente als Ladekontrolle

Letztlich sollte die Auswirkung von Koffein auf die Proteinmenge von Mcl1 untersucht werden. Dazu wurde ein Zeitverlaufsexperiment durchgeführt und unbehandelte oder mit Koffein behandelte U2OSMycER Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten nach Myc-Aktivierung geerntet. Wie bereits beschrieben, nahm das Proteinlevel von Mcl1 abhängig von Myc in den unbehandelten Zellen ab. Dies korrelierte mit einer Zunahme an gespaltener Kaspase3 (Abb.4.15). Durch die Inkubation mit Koffein blieb das Level von Mcl1 über die Dauer des Versuchs konstant und eine erhöhte Spaltung von Kaspase3 wurde unterbunden.

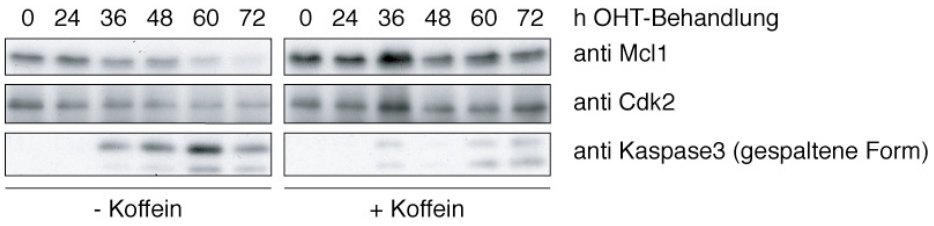


Abbildung 4.15: Die Inkubation mit Koffein verhindert den Abbau von Mcl1 im Verlauf der Myc-induzierten Apoptose
U2OSMycER Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Tagen mit 4-OHT behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Im Immunoblot wurde die Degradation von Mcl1 abhängig von der Inkubation mit Koffein dokumentiert. Cdk2 diente als Ladekontrolle.

4.2 Auswirkungen der MycV394D-Mutation auf die von c-Myc gesteuerte Tumorgenese in einem transgenen Mausmodell

4.2.1 MycV394D Tumore zeigen eine Verringerung der Proliferationsrate durch eine Akkumulation in der G2/M Phase

Um die zellulären Prozesse aufzuklären, die für das verzögerte Auftreten der von MycV394D gesteuerten T-Zell-Lymphome im Vergleich zu Myc-wt gesteuerten T-Zell-Lymphomen verantwortlich sind, wurden immunhistochemische Analysen an Tumorpräparaten durchgeführt. Dazu wurden Tumore beiden Genotyps unmittelbar nach deren Isolation fixiert, in Paraffin eingebettet und Tumorschnitte angefertigt.

Da die Verzögerung der Tumorgenese in MycV394D-exprimierenden Tumoren nicht auf vermehrte Apoptose zurückgeführt werden konnte (Tobias Otto, persönliche Mitteilung), konzentrierten sich die Experimente auf eingehende Untersuchungen der Zellproliferation und der zellulären Seneszenz.

Zur Markierung proliferierender Zellen wurde an Tumoren erkrankten Mäusen mindestens 3h vor Tumorentnahme das Thymidinanalogon Bromdesoxyuridin (BrdU) injiziert. BrdU wird anstelle von Thymidin in die DNA von proliferierenden Zellen eingebaut und gibt immunhistochemisch einen Aufschluss über die Anzahl proliferierender Zellen innerhalb des getesteten Gewebes.

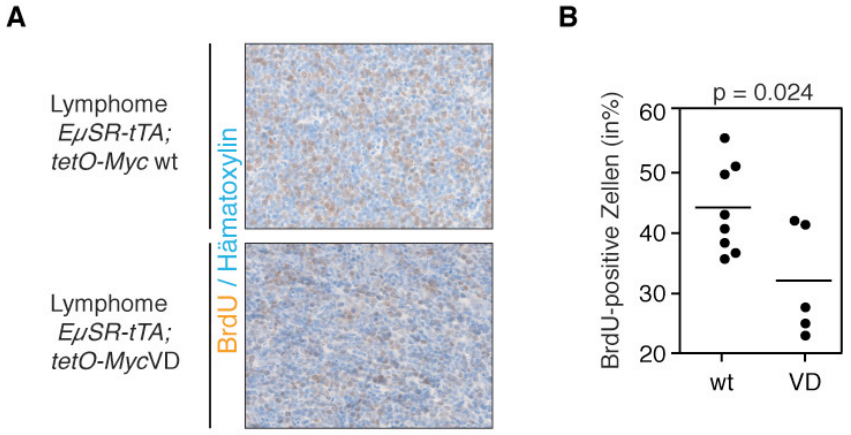


Abbildung 4.16: MycV394D-exprimierende Tumore weisen eine verminderte Proliferationsrate auf.
(A) Erkrankten Mäusen wurden mindestens 3h vor Organentnahme 200µg BrdU intraperitoneal injiziert. Die Tumore wurden in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und in einer Schnittdicke von 5µm mit einem BrdU spezifischen Antikörper (HRP-Substrat stabiles DAB; orange) gefärbt. Zur Gegenfärbung der Zellkerne diente Hämatoxylin (blau). (B)Quantifizierung von 8 Myc-wt im Vergleich zu 5 MycV394D Tumoren. Die statistische Auswertung basiert auf einem zweiseitigem Mann-Whitney-Test und wurde mit Hilfe von GraphPad Prism bestimmt.

Die immunhistochemische Färbung mit einem gegen BrdU gerichteten Antikörper machte BrdU-positive Zellen durch ein nukleäres Signal sichtbar, welches mit der Hämatoxylin-Kernfärbung kolokalisierte (Abb.4.16A). Unbehandelte Tumore zeigten keine spezifische Färbung (Daten nicht gezeigt). Eine Analyse von 8 Myc-wt-exprimierenden Tumoren ergab eine durchschnittliche Proliferationsrate von 45% die in MycV394D-exprimierenden Tumoren um mehr als 10% vermindert ist (Abb.4.16B)

Zur weiteren Charakterisierung des Proliferationsdefekts in MycV394D-exprimierenden Tumoren wurde die Expression wesentlicher Zellzyklusregulatoren mittels Immunoblot und immunhistochemischer Färbung untersucht. Für die E2F1-Zielgene Mcm7, Zyklin A und Zyklin B konnte keine veränderte Expression zwischen Myc-wt- und MycV394D-exprimierenden Tumoren detektiert werden (Abb.4.17). Die durch Cdks induzierte Phosphorylierung des Retinoblastomaproteins (pRb), war innerhalb beider Gruppen nicht gegensätzlich reguliert (Daten nicht gezeigt). Ebenso konnte innerhalb der Tumorgruppen keine unterschiedliche Expression von PCNA, sowie Phosphorylierung des Histons H3, immunhistochemisch nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

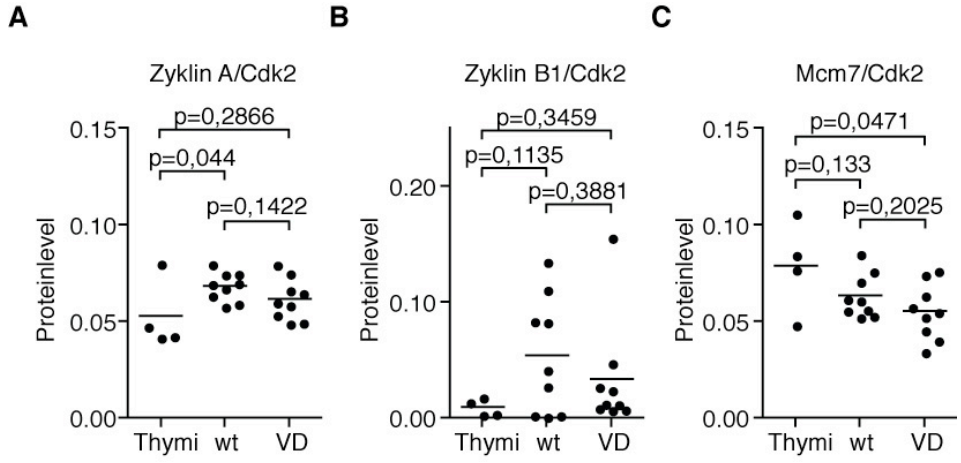


Abbildung 4.17: Die Proteinexpression der Zellzyklusregulatoren Zyklin A, Zyklin B1 und Mcm7 ist innerhalb der Tumorgruppen Myc-wt und MycV394D unverändert.
(A) Proteinlysate wurden im Immunoblot analysiert und auf die Expression von Zyklin A relativ zur Ladekontrolle Cdk2, quantifiziert. Die statistische Auswertung von 9 Myc-wt und 9 MycV394D-exprimierenden Tumoren wurde mit Hilfe von GraphPad Prism erstellt. Als Kontrolle dienten Lysate aus naiven und prälymphogenen Thymi. (B) Analyse der Expression von Zyklin B1, ansonsten wie in A. (C) Analyse der Expression von Mcm7, ansonsten wie in A. Die statistische Berechnung der p-Werte basiert auf einem ungepaarten t-Test und wurde mit Hilfe von GraphPad Prism bestimmt.

Die Untersuchung der Expression der Zyklin-abhängigen Kinase Cdk1 (auch Cdc2) in Myc-wt und MycV394D-exprimierenden Tumoren erbrachte einen signifikanten Unterschied (Abb.4.18). In MycV394D-exprimierenden Tumoren waren die Mengen von Cdc2 geringer in als Myc-wt-

exprimierenden Tumoren. Im Gegensatz dazu lag Cdc2 in MycV394D-exprimierenden Tumoren verstärkt in einem an Thr15 phosphorylierten Status vor.

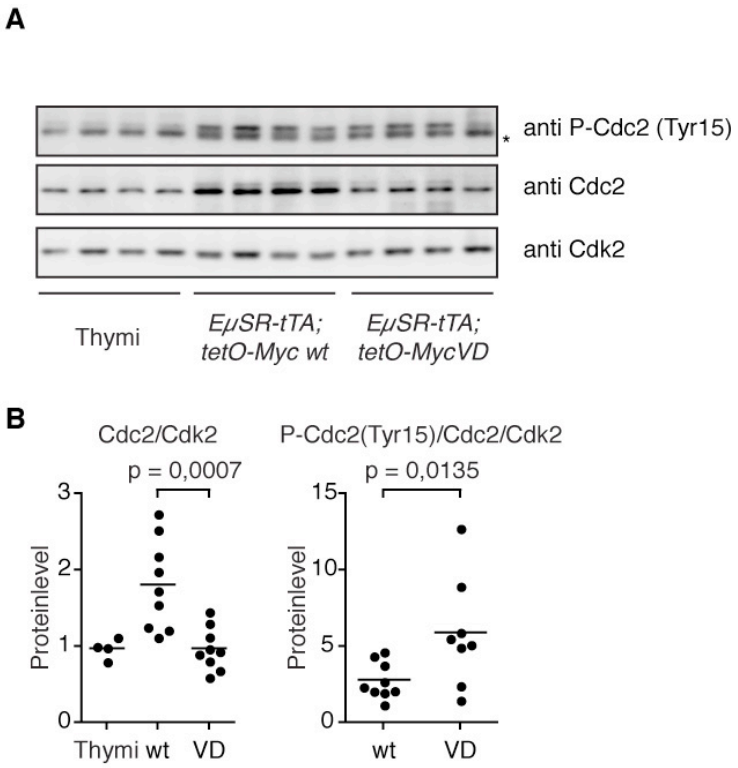


Abbildung 4.18: Die Expression von Cdk1 (Cdc2) ist in MycV394D-exprimierenden Tumoren erniedrigt, allerdings liegt das Protein in MycV394D-exprimierenden Tumoren hyperphosphoryliert vor.
(A) Die Immunoblot Analyse zeigt die Expression von unmodifiziertem Cdc2, sowie an Threonin15 phosphoryliertem Cdc2, relativ zur Ladekontrolle Cdk2. (B) Quantifizierung von A. Die statistische Auswertung basiert auf einem ungepaarten t-Test und wurde mit Hilfe von GraphPad Prism bestimmt.

4.2.2 MycV394D-exprimierende Tumore weisen eine erhöhten Prozentsatz seneszenter Zellen auf

Die Seneszenz ist ein Mechanismus, der das Wachstum von Zellen irreversibel hemmt und zu einem permanenten Austritt aus dem Zellzyklus führt (d'Adda di Fagagna, 2008). Ein etablierter Marker zellulärer Seneszenz ist die Akkumulation der Trimethylierung an Lysin 9 des Histons H3 (H3K9triMe). Zum Nachweis dieser Histonmodifikation wurden Myc-wt- und MycV394D-exprimierende Tumore mit einem spezifischen H3K9triMe-Antikörper immunhistochemisch angefärbt. Positive Zellen wiesen eine punktierte Färbung im Zellkern auf (Abb.4.19A). Die Quantifizierung der Färbung ergab einen erhöhten Anteil positiv gefärbter Zellen in MycV394D-exprimierenden Tumoren im Vergleich zu Myc-wt-exprimierenden Tumoren (Abb.4.19B)

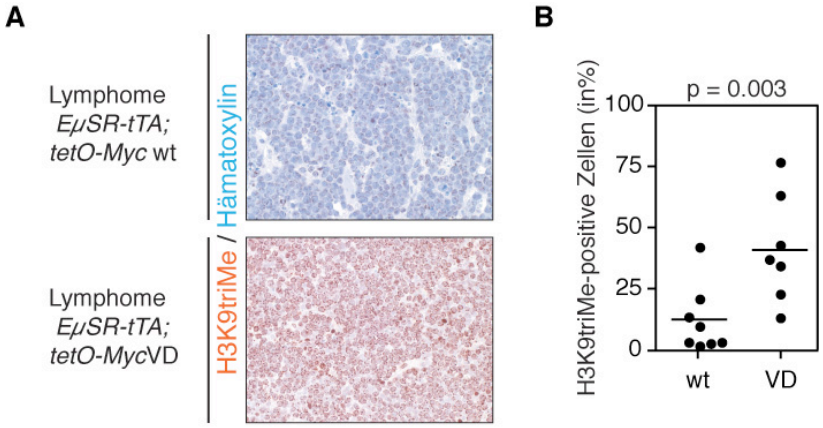


Abbildung 4.19: MycV394D-exprimierende Tumore bestehen zu einem erheblichen Anteil aus H3K9triMe-positiven Zellen.
(A) Zum Nachweis der Seneszenz wurden in Formalin fixierte Paraffinschnitte von Lymphomen mit einem für die Histonmodifikation H3K9triMe spezifischen Antikörper (rot) gefärbt. Zur Gegenfärbung der Zellkerne diente Hämatoxylin (blau). (B) Quantifizierung von 8 Myc-wt im Vergleich zu 7 MycV394D-exprimierendenTumoren. Die statistische Auswertung basiert auf einem zweiseitigen Mann-Whitney-Test und wurde mit Hilfe von GraphPad Prism bestimmt.

Die Färbung von Tumorschnitten mit Ki67, einem weiteren etablierten Proliferationsmarker, ließ keinen Unterschied in seiner Expression innerhalb der Tumorgruppen erkennen (Tobias Otto, persönliche Mitteilung). Die Doppelfärbung von H3K9triMe und Ki67 zeigte, dass im Gegensatz zu Myc-wt in MycV394D-exprimierenden Tumoren eine deutliche Fraktion an für H3K9triMe und Ki67 doppelt-positiver Zellen auftrat (Abb.4.20). Somit tragen MycV394D-exprimierende Zellen sowohl Kennzeichen der Seneszenz, als auch der Proliferation und befinden sich somit offenbar nicht in einem Zustand der vollständigen Seneszenz.

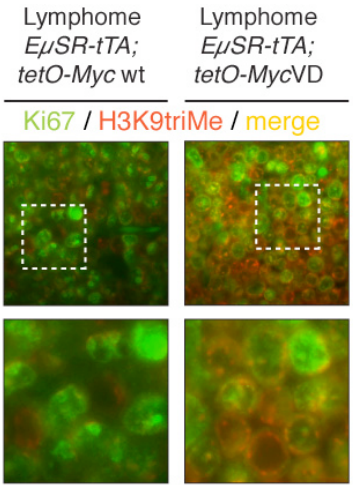


Abbildung 4.20: In MycV394D-exprimierenden Tumore finden sich Ki67/H3K9triMe doppelt positive Zellen
In Formalin fixierte Paraffinschnitte einer Dicke von 5µm wurden parallel in der Immunfluoreszenz auf die Expression von Ki67 und H3K9triMe hin analysiert. Ki67 wurde mit einem Alexa 488 gekoppelten

Sekundärantikörper sichtbar gemacht (grün), als Sekundärantikörper für die H3K9triMe-Färbung wurde Alexa 564 (rot) verwendet. Im *merge* erscheinen Zellen, die beide Proteine exprimieren in gelb.

4.2.3 In MycV394D-exprimierenden Tumoren sind die Mengen von p15Ink4b erhöht

Seneszenz kann durch eine Vielzahl zellulärer Ereignisse hervorgerufen werden. Oft spielt dabei der Zellzyklusinhibitor p19Arf eine tragende Rolle. Durch eine Induktion oder Stabilisation von p19Arf wird Mdm2 gehemmt, was in der Folge zu einem verminderten Abbau des Tumorsuppressors p53 führt. Eine Beteiligung von p53 konnte nicht nachgewiesen werden (Tobias Otto, persönliche Mitteilung). Dennoch sollte die Expression von p19Arf auf mRNA, sowie auf Proteinebene untersucht werden. Im Vergleich zu Thymi regulieren Tumore die Menge von p19Arf sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Proteinebene hoch (Abb.4.21). Innerhalb der Tumore konnte abhängig von der Myc Expression kein Unterschied festgestellt werden.

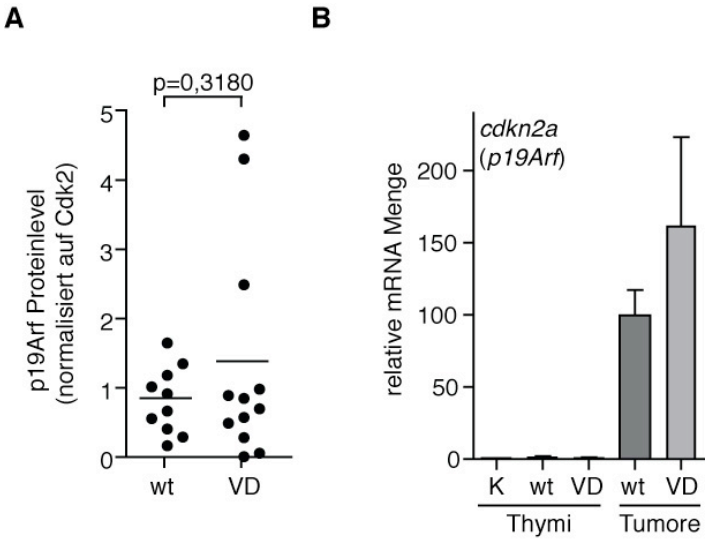


Abbildung 4.21: Die Expression von p19Arf unterscheidet sich innerhalb der beiden Tumorgruppen weder auf Protein- noch auf RNA-Ebene
(A) Tumorlysate wurden im Immunoblot auf deren Expression von p19Arf untersucht und relativ zur Ladekontrolle Cdk2 quantifiziert. Die statistische Auswertung von 9 Myc-wt im Vergleich zu 11 MycV394D-exprimierenden Tumoren ergibt eine statistische Auswertung, die mit Hilfe von GraphPad Prism erstellt wurde. (B) Es wurden je 3 prälymphogene Thymi jedes Genotyps und 5, bzw.4 Tumore jeden Genotyps mittels qPCR auf die Menge an *p19Arf* mRNA hin untersucht. Die Werte wurden auf *Actb* normalisiert und relativ zum Thymus einer nicht transgenen Maus dargestellt.

Unabhängig von p53 kann Seneszenz durch Induktion der Zellzyklusinhibitoren p16Ink4a, p15Ink4b und p21Cip1 eingeleitet werden (Serrano *et al.*, 1997). Eine Relevanz von *p16Ink4a* und *p21Cip1* konnte nicht nachgewiesen werden. Eine erhöhte Transkription von *p15ink4b* in MycV394D-exprimierenden Tumoren konnte bereits gezeigt werden (Tobias Otto, persönliche

Mitteilung) und im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (Abb.4.22A). Die höheren mRNA-Mengen spiegelten sich auch auf Proteinebene wider, was ein Vergleich von 6 Myc-wt und 7 MycV394D-exprimierender Tumore ergab (Abb.4.22B und C).

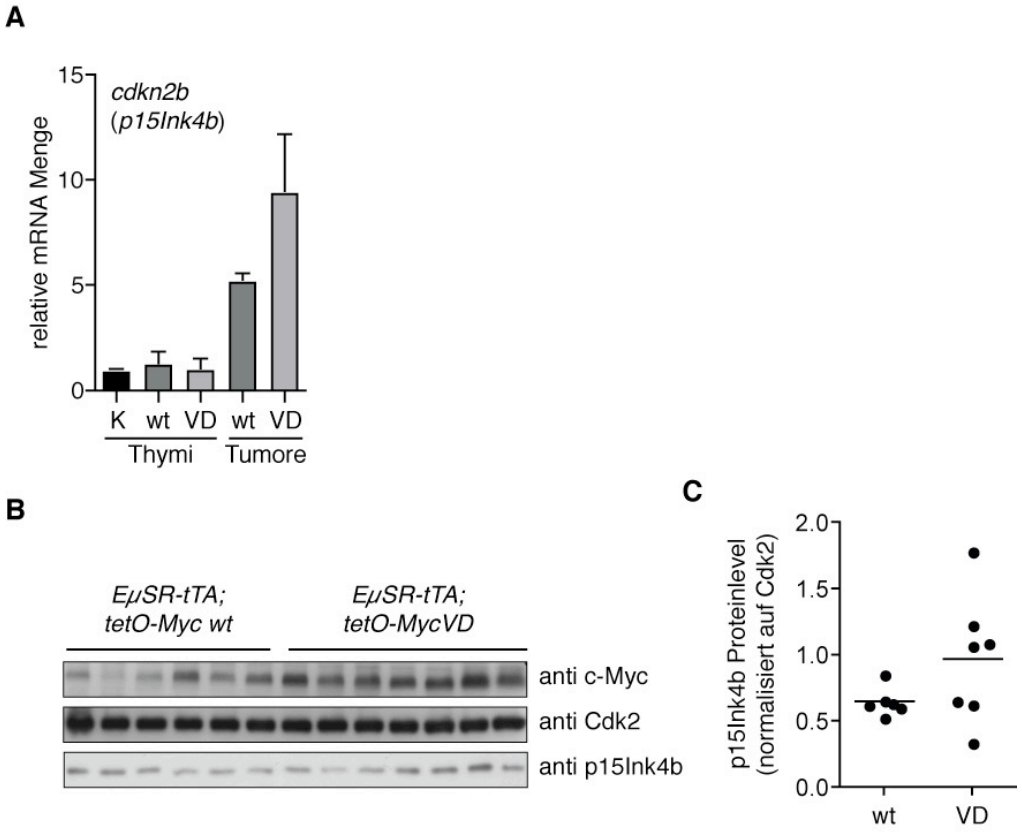


Abbildung 4.22: Sowohl mRNA- als auch Proteinmengen von p15Ink4b sind in MycV394D-exprimierenden Tumoren erhöht.
(A) Es wurden in je 3 prälymphogene Thymi jeden Genotyps und 5, bzw.4 Tumore jeden Genotyps mittels qPCR die Menge an *p15ink4b*-spezifischer mRNA untersucht. Die Werte wurden auf *Actb* normalisiert und relativ zu Thymi (n=3) von nicht transgenen Mäusen dargestellt. (B) Die Expression von p15Ink4b von 6 Myc-wt-exprimierender Tumore und 7 MycV394D-exprimierender Tumore wurde im Immunoblot untersucht. Cdk2 diente als Ladekontrolle. (C) Quantifizierung der p15Ink4b Expression aus B, normalisiert auf die Ladekontrolle.

4.2.4 Miz1-Proteinmengen sind im Vergleich zu Myc-Mengen nicht verändert

Resultierend aus einer positiven Selektion, wurden die Mengen von Myc im Laufe der Tumorgenese in MycV394D-exprimierenden Tumoren im Vergleich zu Myc-wt-exprimierenden Tumoren erhöht (Abb.4.22B). Die Expression von Miz1, dem Interaktionspartner von Myc, veränderte sich allerdings abhängig von der Abstammung der Tumore nicht. Demnach spielt die Expression von Miz1 keine Rolle beim verlangsamten Wachstum der MycV394D-

exprimierenden Tumore und gesteigerte Mengen an Miz1 rufen keinen Selektionsvorteil hervor (Abb.4.23).

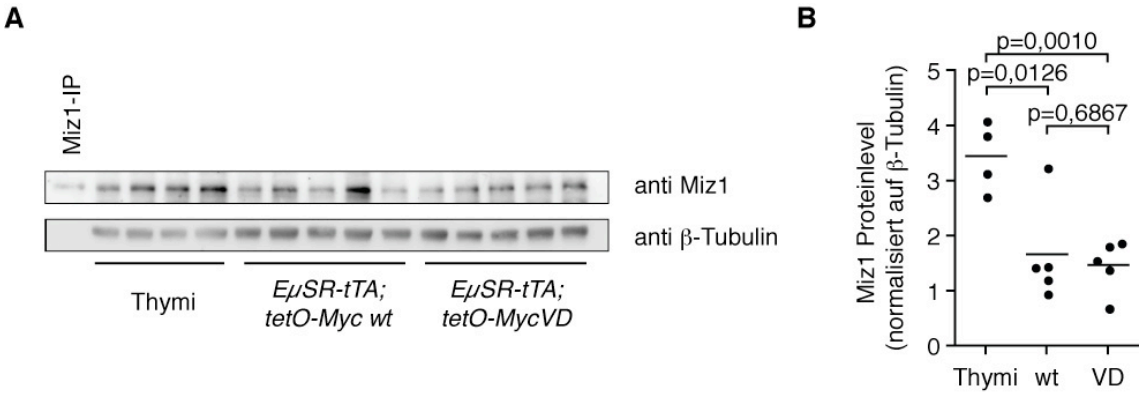


Abbildung 4.23: Ein Unterschied in der Miz1-Expression konnte nicht beobachtet werden.
(A) Mittels Immunoblot wurde die Expression von Miz1 aus 4 Thymi und je 5 Myc-wt bzw. MycV394D-exprimierenden Tumoren untersucht. Als Ladekontrolle diente β–Tubulin. Das Proteinlysat einer Miz1-Immunopräzipitation diente zur Detektion der korrekten Proteinbande. (B) Quantifizierung der Miz1 Expression aus A, normalisiert auf die Ladekontrolle.

4.2.5 *Cdkn2b* ist ein direktes Zielgen von Myc

Um zu testen, inwieweit Myc eine direkte Rolle auf die Transkription von *p15Ink4b* im von Myc induzierten Tumormodel ausüben kann wurden Chromatin-Immunopräzipitations (ChIP)-Experimente durchgeführt. Homogenisierte Tumorzellen wurden sofort nach deren Entnahme aus der Maus fixiert und Chromatin präpariert. Die Immunopräzipitation wurde mit einem für humanes und murines c-Myc spezifischen Antikörper durchgeführt. Als Kontrollantikörper wurde ein unspezifischer Antikörper des gleichen Isotyps verwendet.

Als Kontrolle für ein durch c-Myc aktiviertes Gen konnten sowohl Myc-wt als auch MycV394D auf dem Promotor des für die Histonmodifikation *H2a.z* kodierenden Gens nachgewiesen werden (Abb.4.24A). Ebenso wie *p15Ink4b* wird auch die Transkription von *p21Cip1* durch die Myc/Miz1-Interaktion reprimiert. Auf beiden Promotoren konnte im Vergleich zum Kontrollantikörper eine Anreicherung des Myc-Proteins detektiert werden wohingegen auf der Kontrollregion innerhalb des Introns7 des *Cdkn2b* Lokus keine Akkumulation von Myc nachgewiesen werden konnte (Abb.4.24B). Für den *Cdkn2b* Lokus wurde dieses Experiment zweimal wiederholt und das Ergebnis konnte entsprechend reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

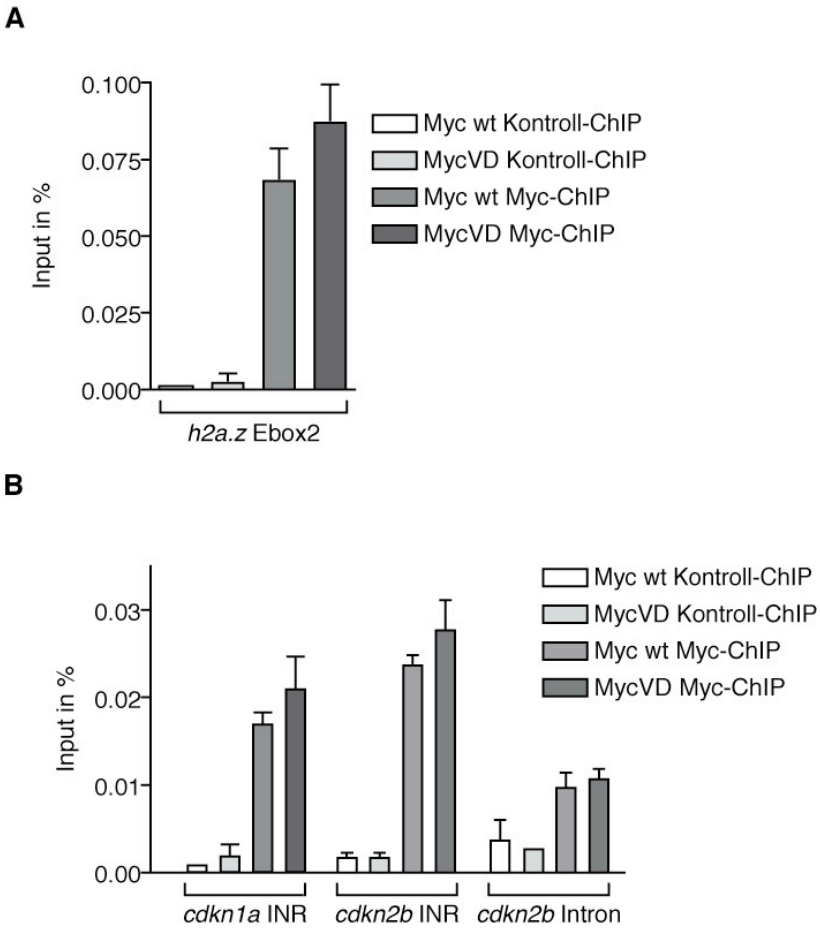


Abbildung 4.24: Myc-wt sowie MycV394D interagieren mit den Promotoren von Myc-Zielgenen
ChIP Experimente aus Tumorproben beweisen die Anwesenheit beider Myc Varianten auf dem Promotor der Histonvariante *H2a.z* (A), *cdkn1a* und *cdkn2b* (C). Als Kontrollantikörper wurde ein unspezifischer Antikörper des Isotyps IgG verwendet.

4.2.6 Myc vermittelt einen direkten Einfluss auf die Repression der Zellzyklusinhibitoren

Aus den Tumoren von wildtyp Myc und der mutierten Form wurden T-Lymphozyten isoliert und über einen gewissen Zeitraum bis zu deren Immortalisierung in Zellkultur kultiviert. Um den direkten Effekt der Transreprimierung von Myc-wt und MycV394D zu vergleichen wurde ein Zeitverlaufsexperiment vorgenommen, bei dem die Expression des transgenen Myc-Proteins durch Zugabe von Doxyzyklin abgeschaltet wurde. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Mittels Immunoblot konnte die vollständige Inhibition der Genexpression von Myc auf Proteinebene dokumentiert werden (Abb.4.25A). Das Abschalten von Myc in diesem Zellsystem führte zu einer erhöhten Expression von p15Ink4b auf Protein- und mRNA-Ebene (Abb.4.25B). Der Vergleich von Myc-wt- und MycV394D-exprimierenden T-

Lymphozyten lässt eine verminderte Transreprimierungsaktivität von MycV394D erkennen. Trotz erhöhter p15Ink4b-Basallevel, sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene in MycV394D-exprimierenden Lymphozyten, lassen sich deren Mengen nach der Inaktivierung von Myc nicht in gleichem Maße hochregulieren wie in Myc-wt-exprimierenden Zellen. Für die beiden weiteren von Myc reprimierten Zielgene *p21Cip1* und *p57Kip2* konnten ähnliche Resultate erzielt werden.

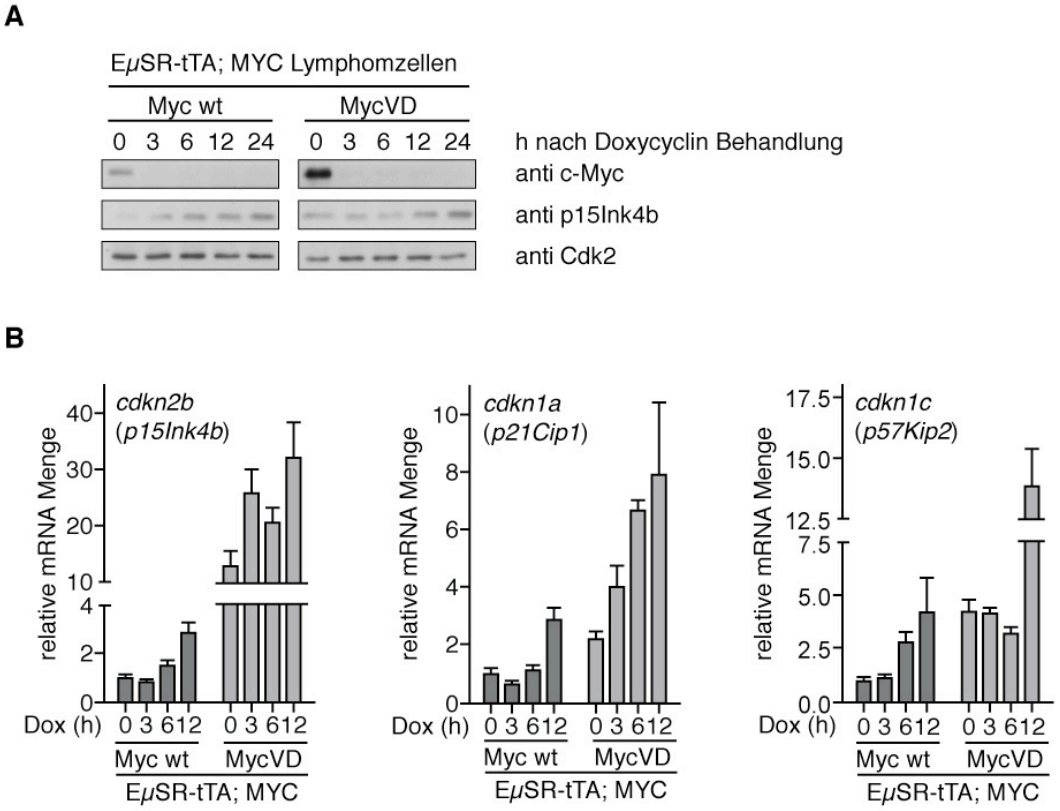


Abbildung 4.25: Die Aktivität des Myc/Miz1-Komplexes wird zur permanenten Repression von p15Ink4b benötigt.
(A) Ein Zeitverlaufsexperiment dokumentiert die Inhibition der Myc Expression nach Doxyzyklin-Zugabe, sowie die dadurch bedingte Induktion von p15Ink4b zweier Zelllinien (Myc-wt und MycV394D) im Immunoblot. Cdk2 diente als Ladekontrolle. (B) Mittels qPCR wurde die Induktion der Zellzyklusinhibitoren *p15Ink4b*, *p21Cip1* und *p57Kip2* nach Zugabe von Doxyzyklin im Vergleich der Myc-wt und MycV394D-exprimierenden Zelllinien untersucht. Die Werte wurden auf die mRNA-Menge von *Actb* normalisiert und relativ zum Basallevel der unbehandelten Myc-wt Zellen dargestellt.

Um ausschließen zu können, dass es sich bei den beobachteten Ergebnissen um klonale Variationen innerhalb der Zelllinien handelt, wurden immortalisierte T-Lymphozyten mit transgenem Myc-wt mit Expressionsplasmiden für Myc-wt beziehungsweise MycV394D infiziert. Nach vollständiger Selektion wurde das transgene Myc durch Zugabe von Doxyzyklin abgeschaltet. Das so konstruierte Zellsystem ermöglicht das Zellwachstum abhängig vom infizierten Expressionsplasmid.

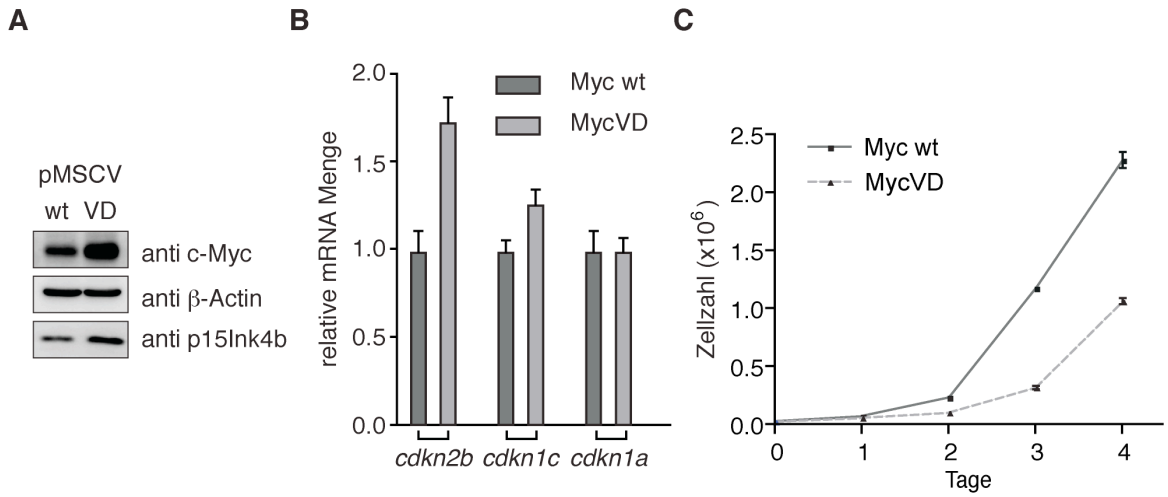


Abbildung 4.26: Rekonstituierte Myc-wt und MycV394D-exprimierende Zellen bestätigen den im Tumormodel beobachteten Phänotyp
Lymphomzellen, transgen für Doxyzyklin-regulierbares Myc, wurden stabil mit Expressionsplasmiden für Myc-wt und MycV394D infiziert und die Expression des transgenen Myc-Proteins abgeschaltet. (A) Der Immunoblot dokumentiert die Expression von exogenem Myc und die dadurch bedingte Expression von p15Ink4b 48h nach Doxyzyklin-Behandlung. β-Actin diente als Ladekontrolle. (B) Mittels qPCR wurde die mRNA-Menge der Zellzyklusinhibitoren *p15Ink4b*, *p57Kip2* und *p21Cip1* in Abhängigkeit der Myc Varianten bestimmt. Die Werte wurden auf die mRNA-Menge von *Actb* normalisiert. (C) Mit Myc-wt und MycV394D stabil infizierte Zellen wurden ab 24h nach Doxyzyklin-Zugabe an 4 aufeinander folgenden Tagen gezählt. Die Fehlerbalken basieren auf technischen Replika.

Die mRNA-Analyse der Zellzyklusinhibitoren *p15Ink4b*, *p57Kip2* und *p21Cip1* bestätigte die aus den Tumorproben bereits bekannten Ergebnisse (Abb.4.26). *P15Ink4b* wurde in rekonstituierten MycV394D-exprimierenden T-Lymphozyten im Vergleich zu Myc-wt 1,7fach hochreguliert (Abb.4.26B). Dies konnte auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb.4.26A). Ebenso erhöhte sich die Transkription von *p57Kip2* in MycV394D-exprimierenden Lymphozyten, wobei die Expression von *p21Cip1* in beiden Zelllinien unverändert blieb. Vergleichbar zu den Tumorproben wurde MycV394D stärker exprimiert als Myc-wt. Die Induktion des Zellzyklusinhibitors *p15Ink4b* und möglicherweise in geringerem Umfang auch *p57Kip2*, resultiert in einer verminderten Proliferationsrate der rekonstituierten MycV394D-exprimierenden Zelllinien (Abb.4.26C).

4.2.7 Der TGFbeta-Signalweg ist in Myc-induzierten Tumoren aktiv

Die Expression von p15Ink4b kann durch zwei bekannte Mechanismen reguliert werden. In humanen Fibroblasten konnte eine von Interleukin6 (IL6) abhängige Aktivierung von p15Ink4b nachgewiesen werden, die Zellen in die Seneszenz treibt (Kuilman *et al.*, 2008).

Entsprechende Analysen in Thymi und lymphogenen Tumoren konnten keinen Hinweis auf eine veränderte mRNA Expression von *Il6* im Laufe der Tumorgenese geben (Abb.4.27A).

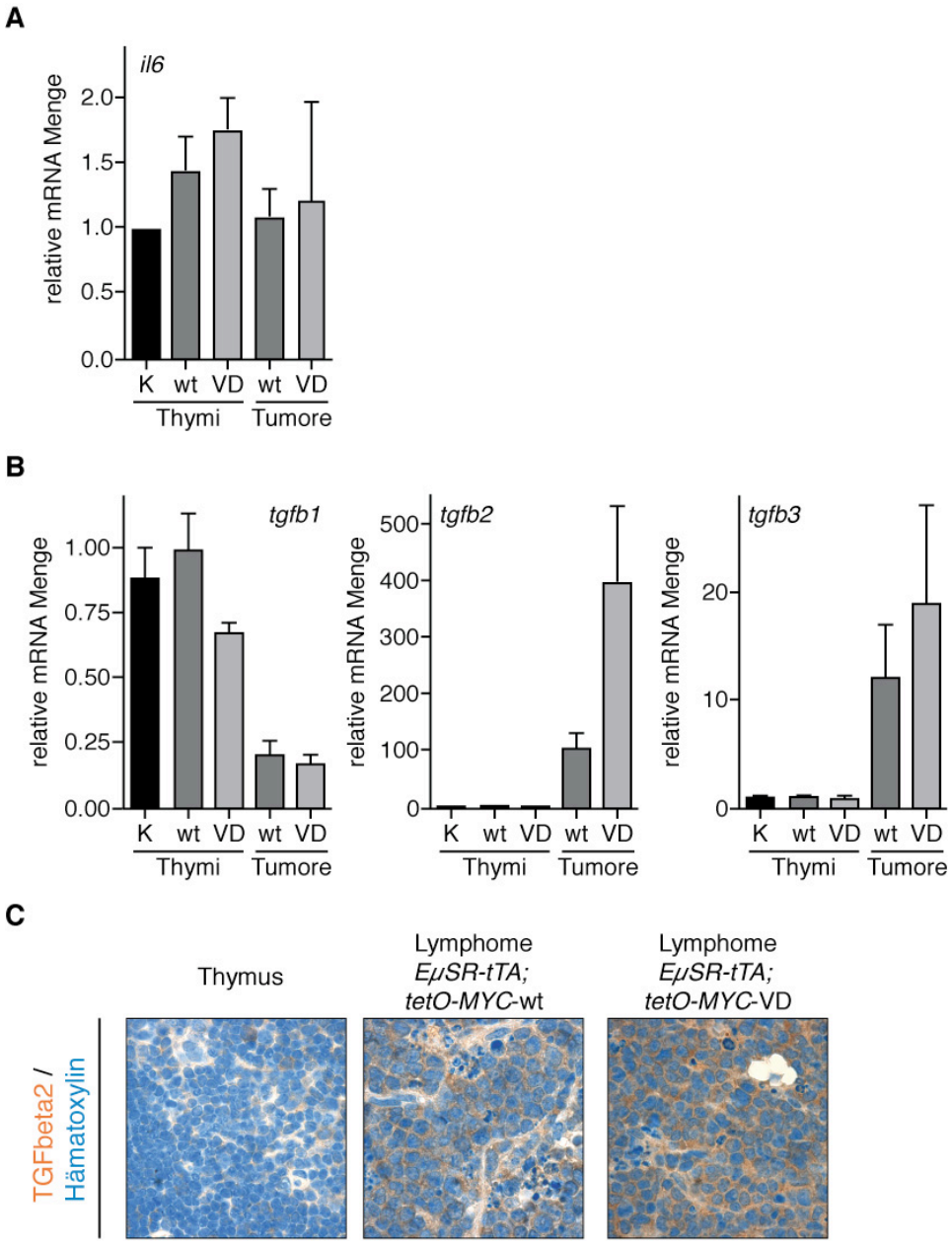


Abbildung 4.27: Im Gegensatz zu *Il6* werden die mRNA-Mengen der *Tgfβ* Formen *1,2* und *3* vom prälymphogenen Stadium zum Tumorstadium reguliert.
(A) Es wurden je 2 nicht-transgene Thymi sowie je 2 prälymphogene Thymi jeden Genotyps und 5, bzw.4 Tumore jeden Genotyps mittels qPCR auf die Menge an *Il6* mRNA untersucht. Die Werte wurden auf *Actb* normalisiert. (B) Quantitative Analyse der mRNA-Mengen der 3 *Tgfβ*-Isoformen wie angegeben. Anzahl der Proben wie in A. (C) Nachweis der Proteinexpression von TGFβ2 mittels immunhistochemischer Färbung an Formalin-fixierten Tumoren. Der TGFβ2 spezifische Antikörper stellt eine extrazelluläre Färbung dar (braun), die nicht mit der Kerngegenfärbung von Hämatoxylin (blau) kolokalisiert.

In hämatopoetischen Zellen kann TGFβ zur Induktion von p15Ink4b führen (Reimann et al, 2010). Um dessen Einfluss zu testen wurde das Transkriptionslevel der drei Formen von *Tgfβ* (*Tgfβ1*, *Tgfβ2* und *Tgfβ3*) mittels quantitativer PCR bestimmt. Im Gegensatz zu *Tgfβ1*, welches in Tumoren schwächer transkribiert wurde als im Thymus, waren die beiden Formen *Tgfβ2* und *Tgfβ3* verglichen mit Kontrollthymi und prälymphogenen Thymi in den Tumoren stark hochreguliert (Abb.4.27B). Dabei fiehl auf, dass in MycV394D-exprimierenden Tumoren die mRNA-Menge von *Tgfβ2/3* im Vergleich zu Myc-wt Tumoren erhöht war. Mittels immunhistochemischer Färbung konnte eine erhöhte TGFβ2 Expression in den Tumoren ebenfalls auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb.4.27C).

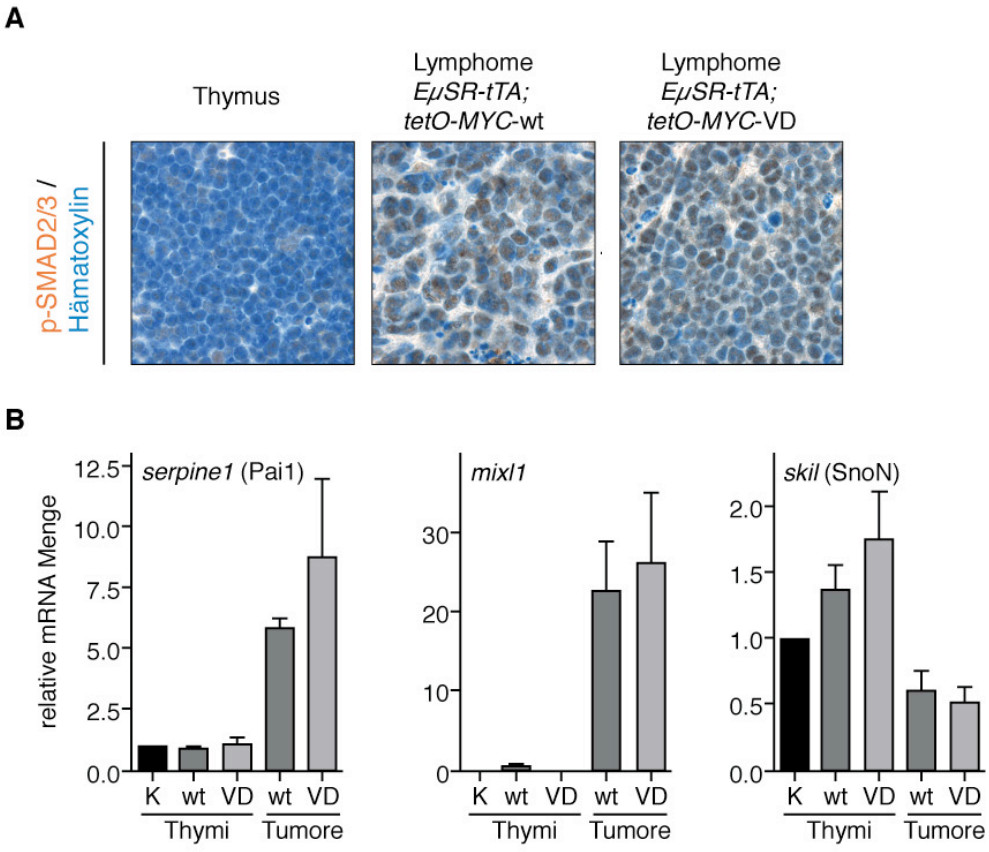


Abbildung 4.28: Die TGFβ-Signalkaskade ist in Myc-gesteuerten Tumoren nicht aber im prälymphogenen Stadium aktiv.
(A) Formalin-fixierte Tumore wurden in Paraffin eingebettet und Schnitte mit einem für die phosphorylierte Form von Smad2/3 an Serin465/467 spezifischen Antikörper angefärbt. Das Signal von aktivem Smad2/3 (braun) kolokalisiert mit der Kernfärbung von Hämatoxylin (blau) im Zellkern. (B) Es wurden je 3 prälymphogene Thymi beiden Genotyps und 5, bzw.4 Tumore jeden Genotyps mittels qPCR auf die mRNA-Mengen der TGFβ-Zielgene *Pai1*, *Mixl1* und *Skil* untersucht. Die Normalisierung erfolgte auf die mRNA-Menge von *Actb*. Die Werte wurden relativ zu einem Thymus einer nicht transgenen Maus dargestellt.

Durch die gegensätzliche Transkription von *Tgfβ1* zu *Tgfβ2* und *Tgfβ3* stellte sich die Frage, ob

in den Lymphomen der TGFβ-Signalweg tatsächlich aktiv ist. Die Phosphorylierung von Smad2/3 gilt als Marker für einen aktiven TGFβ-Signalweg. Im Gegensatz zum Thymus war Smad2/3 in den Tumorproben phosphoryliert und konnte immunhistochemisch im Nukleus der T-Zellen nachgewiesen werden (Abb.4.28A).

Ein weiterer Hinweis auf die Aktivierung des TGFβ-Signalweges in von Myc induzierten Tumoren ergab sich durch die Analyse von vier bekannten TGFβ–Zielgenen. *Pai1* und *Mixl1* werden von TGFβ aktiviert und auch in den Tumoren im Vergleich zu naiven Thymus und prälymphogenen Thymi von hochreguliert (Abb.4.28B). *SnoN* wird durch Aktivierung des TGFβ-Signalweges reprimiert und lag erwartungsgemäß in den untersuchten Lymphomen in verminderten Mengen vor (Abb.4.28B). Mit Ausnahme von *p15nk4b* konnte für die drei weiteren Zielgene des TGFβ-Signalweges keine signifikant unterschiedliche Transkription zwischen Myc-wt- und MycV394D-exprimierenden Tumoren festgestellt werden.

4.2.8 Myc-wt und MycV394D-exprimierende Zellen unterscheiden sich in ihrer Antwort auf TGFβ

In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Myc-gesteuerte Tumore TGFβ exprimierten und möglicherweise dadurch bedingt p15Ink4b reguliert wurde. Um zu untersuchen, ob sich die Stimulation mit TGFβ eine unterschiedliche Antwort in Myc-wt und MycV394D-exprimierenden T-Lymphozyten hervorruft, wurden diese aus Lymphomen isoliert und über einen längeren Zeitraum bis zur Immortalität kultiviert.

Die Zugabe von TGFβ zum Zellkulturmedium bewirkte bereits nach 12h einen Anstieg der Expression des TGFβ-Zielgens p15Ink4b in MycV394D-exprimierenden Zellen, der zu dem entsprechenden Zeitpunkt in Myc-wt-exprimierenden Zellen nicht zu detektieren war (Abb.4.29A). Dennoch konnte gezeigt werden, dass in zumindest 2 von 3 Myc-wt Zelllinien eine intakte Antwort auf TGFβ vermitteln werden konnte, die in einer zu MycV394D-exprimierenden Zellen vergleichbaren Phosphorylierung von Smad3 resultierte (Abb.4.29A).

Der Anstieg von p15Ink4b als Antwort auf TGFβ vermittelt einen Arrest der MycV394D-exprimierenden Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus und in dessen Folge eine verminderte Proliferation (Abb.4.29B). In Myc-wt-exprimierenden Zellen konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. 48h nach Zugabe von TGFβ wurde der Anteil der seneszenten Zellen anhand einer Färbung von Seneszenz-assoziierter-β-Galaktosidase (SA-β-Gal) ermittelt.

Übereinstimmend mit der Untersuchung des Zellzyklusprofils, färbte sich ein großer Anteil der MycV394D-exprimierenden Zellen blau (Abb.4.29C). Die Quantifizierung belegt einen Anstieg seneszenter Zellen von 10% auf 40% wohingegen in den Myc-wt-exprimierenden Zellen nur ein Anstieg von 5% auf 12% zu ermitteln war.

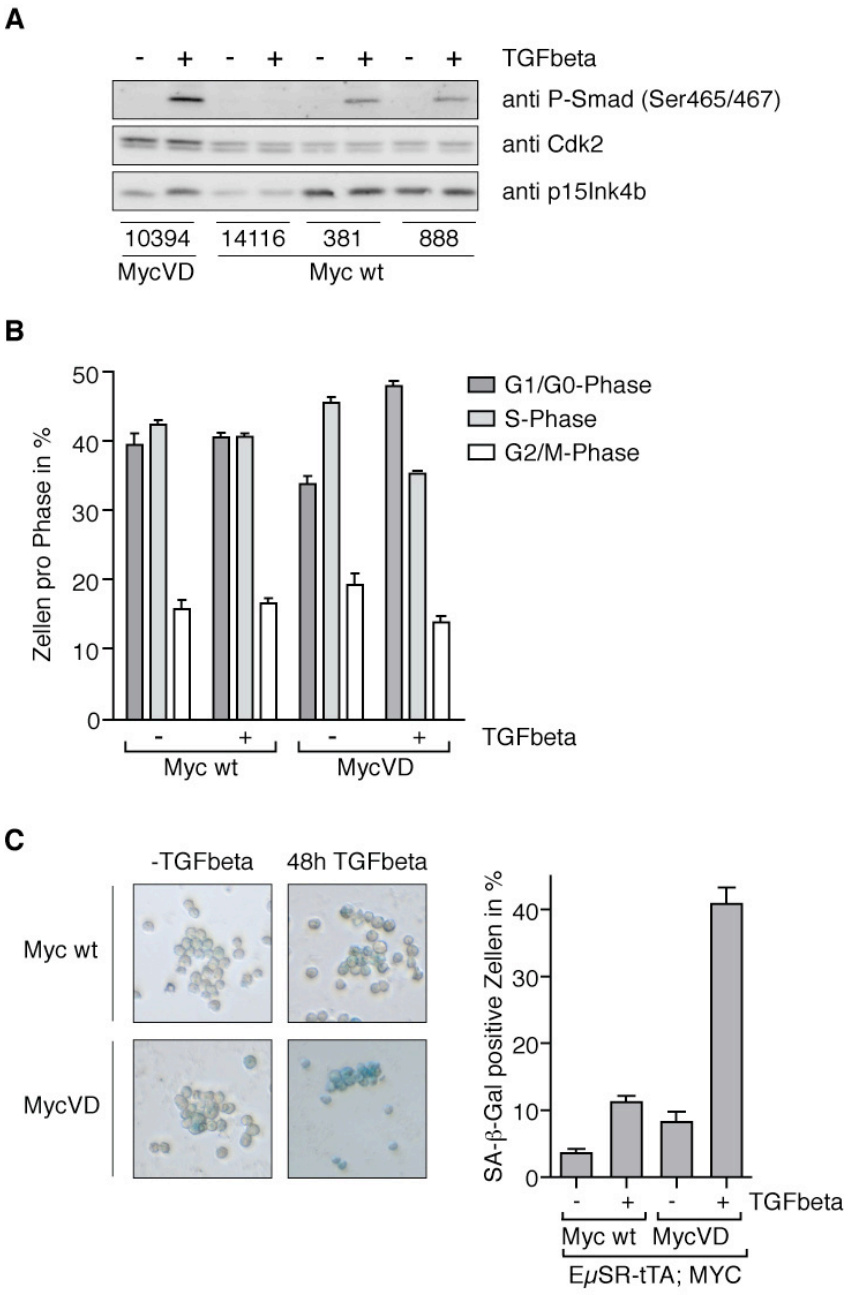


Abbildung 4.29: TGFβ induziert Zellzyklusarrest und Seneszenz spezifisch in MycV394D-exprimierenden Zellen
Aus Myc gesteuerten Tumoren isolierte, immortalisierte T-Lymphomzellen wurden mit TGFβ behandelt und zu angegebenen Zeitpunkten im Immunoblot, in der Durchflusszytometrie und in Färbung für Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase (SA-β-Gal) analysiert. (A) Die TGFβ-abhängige Induktion von

p15Ink4b 12h nach Behandlung wurde in 3 Myc-wt-exprimierenden Zelllinien im Vergleich zu einer MycV394D-exprimierenden Zelllinie untersucht. Die Phosphorylierung von Smad beweist die vergleichbare Aktivität des Signalweges der unterschiedlichen Zelllinien. Cdk2 diente als Ladekontrolle. (B) Das Zelllzyklusprofil der Myc-wt und MycV394D-exprimierenden Zelllinien im unbehandelten Zustand und 24h nach TGFβ Zugabe. (C) Darstellung eines Ausschnitts der SA-β-Gal Färbung 48h nach Induktion durch TGFβ. Und Quantifizierung der Färbung. Fehlerbalken ergaben sich aus 3 unabhängigen Zählungen.

Myc-wt- und MycV394D-exprimierende Zellen wurden mit einem GFP-gekoppelten Expressionsplasmid, das für die Ektodomäne des TGFβ Rezeptors II (TβR-II-ED) kodiert, lentiviral infiziert und eine vergleichbare Expression durch durchflusszytometrische Messung der GFP Expression sichergestellt (Daten nicht gezeigt). Die Expression des TβR-II-ED, welche zur Stilllegung der TGFβ-Signalkaskade führt (Thomas und Massague, 2005) wirkte sich selektiv auf das Wachstum der MycV394D-exprimierenden Zellen aus. Diese erhöhen ihre Proliferationsrate, wohingegen das Wachstum der Myc-wt-exprimierenden Zellen durch die Expression des Rezeptors nicht beeinflusst wurde (Abb.4.30).

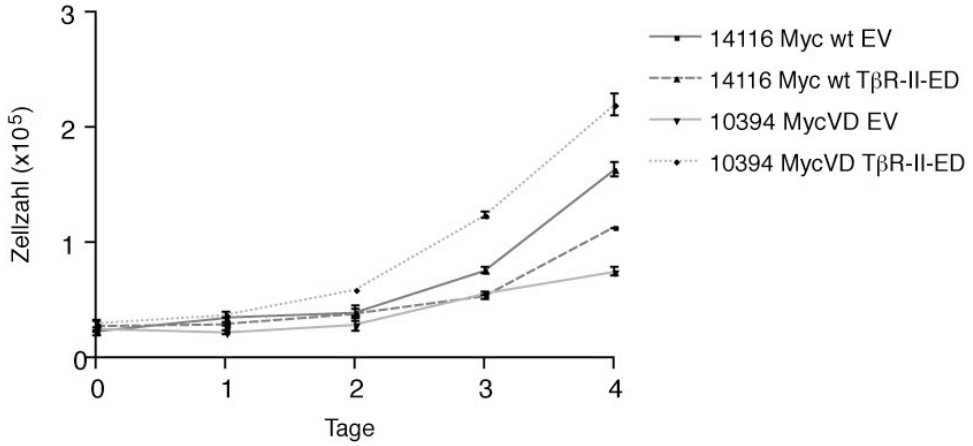


Abbildung 4.30: Die Expression des TβR-II-ED beschleunigt das Wachstum von MycV394D-exprimierenden Zellen.
48h nach Infektion mit einem Kontrollplasmid oder dem Expressionsplasmid für TβR-II-ED wurden Myc-wt- und MycV394D-exprimierende Zellen an 4 aufeinanderfolgenden Tagen gezählt und deren Proliferation anhand einer Wachstumskurve dargestellt.

4.2.9 Die Expression des TβR-II-ED vermindert die Induktion der Seneszenz *in vivo*

Die Inhibition der Transkription von transgenem Myc-wt durch die Zugabe von Doxyzyklin zum Zellkulturmedium führte zu einer erhöhten Expression der Zellzyklusinhibitoren *p15Ink4b*, *p21Cip1* und *p57Kip2* (Abb.4.25B). Nach andauernder Inkubation in Doxyzyklin-haltigem Medium wiesen die Zellen eine positive Blaufärbung in der SA-β-Gal-Untersuchung auf, was darauf schließen lässt, dass sie seneszent wurden (Jan van Riggelen, persönliche Mitteilung). Die

Expression des TβR-II-ED im Zellkulturexperiment vermindert sowohl die Induktion der Zellzyklusinhibitoren als auch den Prozess der Seneszenz (Jan van Riggelen, persönliche Mitteilung).

Um diese Beobachtungen im Mausmodel nachzuweisen, wurden immunokompetenten Mäusen Lymphomzellen injiziert, die zuvor mit einem Kontrollplasmid (GFP) oder dem Expressionsplasmid für TβR-II-ED stabil infiziert worden waren. Nach Ausbildung von Lymphomen wurde den Tieren Doxyzyklin in Form des Trinkwassers verabreicht, um die Expression des transgenen Myc-Proteins abzuschalten. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben der sich zurückbildenden Tumore entnommen und immunhistochemisch analysiert.

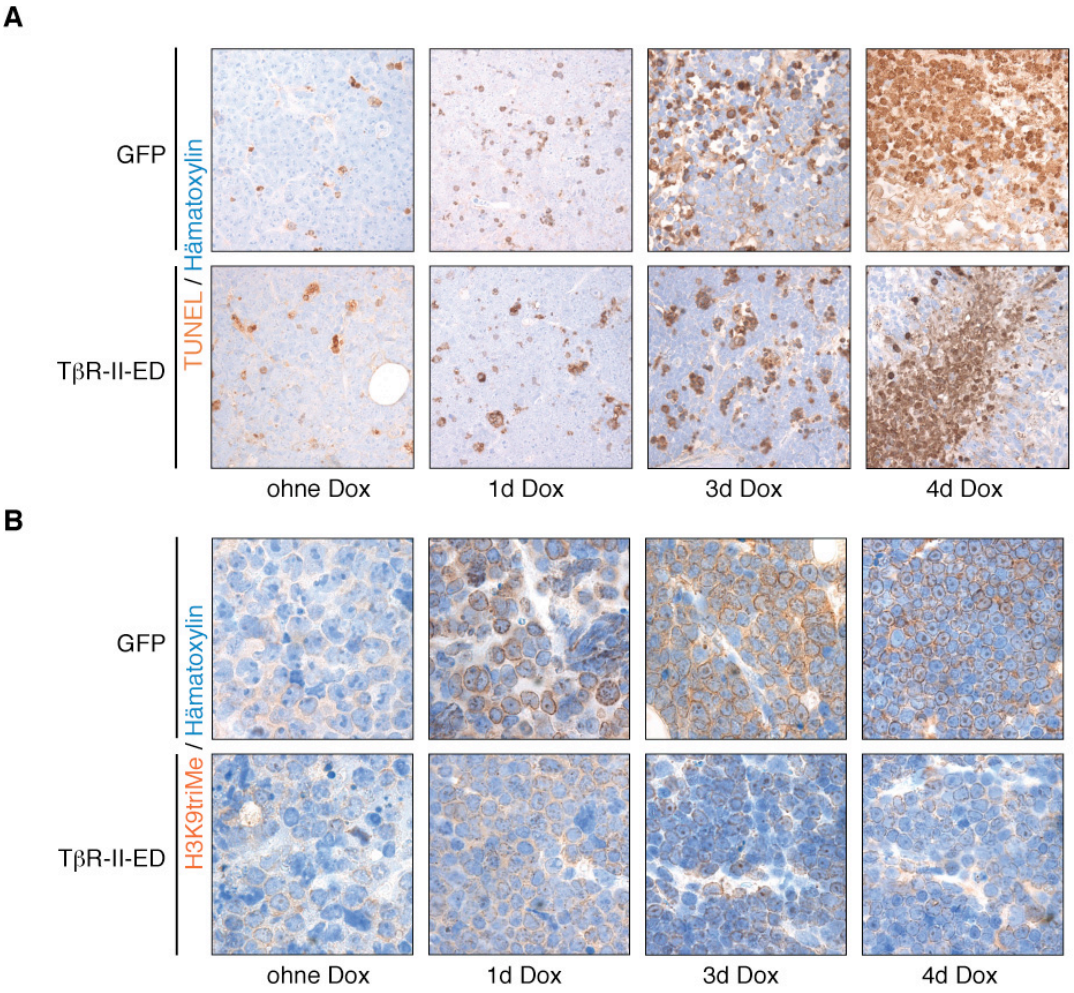


Abbildung 4.31: TGFβ-unabhängige und –abhängige zelluläre Prozesse nach Abschalten der transgenen Myc Expression.
T-Lymphozyten wurden mit einem Kontrollplasmid (GFP) und dem Expressionsplasmid für TβR-II-ED infiziert und subkutan in immunkompetente Mäuse injiziert. Nach einer sichtbaren Tumorentwicklung wurde die transgene Myc-Expression durch Doxyzyklin abgeschaltet und die Tumorproben zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. (A) Mittels TUNEL Assay (rot) wurde der Gehalt an apoptischen

Zellen bestimmt. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte durch Hämatoxylin (blau) (B) Die immunhistochemische Färbungen von H3K9triMe dokumentiert punktuelle Färbung innerhalb der Zellkerne (rot), die mit der Kerngegenfärbung durch Hämatoxylin (blau) kolokalisieren.

Die Tumorregression kann sowohl durch Apoptose als auch durch Seneszenz bedingt werden (Wu *et al.* 2008). Mit Hilfe des TUNEL Assays konnte fokal eine nach Doxyzyklin-Behandlung ansteigende Apoptoserate sowohl in Kontroll- als auch in TβR-II-ED-exprimierenden Mäusen nachgewiesen werden (Abb.4.31A).

Zum Nachweis der Seneszenz wurden die Präparate auf die Anwesenheit der Trimethylierung des Lysin9 von Histon H3 untersucht. Bereits 1 Tag nach Behandlung mit Doxyzyklin stieg der Anteil an H3K9triMe-positiven Zellen in den Kontrolllymphomen, der sich im Laufe des Zeitverlaufsexperiments weiter erhöhte (Abb.4.31B). Im Gegensatz dazu vermindert die Expression des TβR-II-ED die Ausprägung der Histonmodifikation.

4.2.10 *Tgfβ2/3* sind direkte Zielgene von Myc

Das Abschalten von Myc im Zellkulturexperiment führte zu einer Phosphorylierung von Smad2/3 und steigerte damit die Aktivität der TGFβ-Signalkaskade (Abb.4.32A). Beim Vergleich zweier T-Lymphomzelllinien, die jeweils aus einem von Myc-wt und einem von MycV394D gesteuerten Tumor isoliert wurden, konnte im Verlauf eines Zeitverlaufsexperiments ein durch die Inhibition der Myc Expression vermittelter Anstieg der TGFβ-Menge auf mRNA-Ebene gemessen werden (Abb.4.32B). In den MycV394D gesteuerten Zelllinien erhöhten sich die Mengen beider Isoformen *Tgfβ2* und *Tgfβ3*, wohingegen in der Myc-wt-gesteuerten Zelllinie keine Expression von *Tgfβ2*, jedoch aber eine gesteigerte Transkription von *Tgfβ3* zu detektieren war.

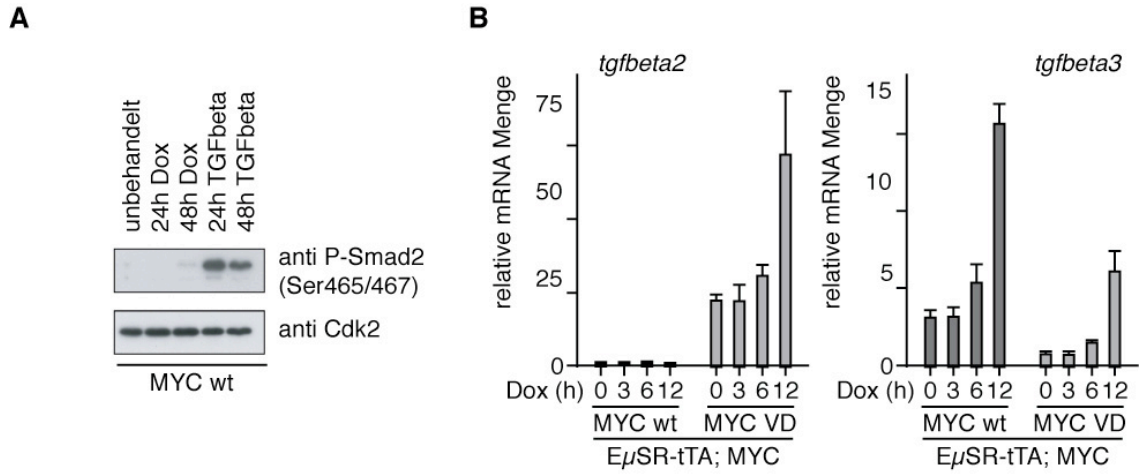


Abbildung 4.32: Myc reguliert die Transkription von *Tgfβ* im Zellkulturexperiment
Mittels qPCR wurde die Induktion der *Tgfβ* Isoformen *2* und *3* abhängig von der Doxyzyklin-Zugabe in Myc-wt- und MycV394D-exprimierenden Zelllinien untersucht. Die Werte wurden auf die mRNA-Menge von *Actb* normalisiert und relativ zum Basallevel der unbehandelten Myc-wt-exprimierenden Zellen dargestellt.

Es stellte sich die Frage, inwieweit es sich dabei um einen direkten Effekt handelt, den Myc auf die Transkription von *Tgfβ* ausüben kann. Durch ChIP Analysen konnte die Anwesenheit des Proteins Myc auf den Promotoren von *Tgfβ2* und *Tgfβ3* nachgewiesen werden (Abb.4.33). Im Gegensatz zu den Kontrollregionen, die jeweils mehrere tausend Basenpaare aufwärts der Promotoren liegen, konnten sowohl Myc-wt als auch MycV394D in der unmittelbaren Promoterregion der Gene detektiert werden. Die Präzipitation mit einem IgG-Kontrollantikörper ergab kein Signal.

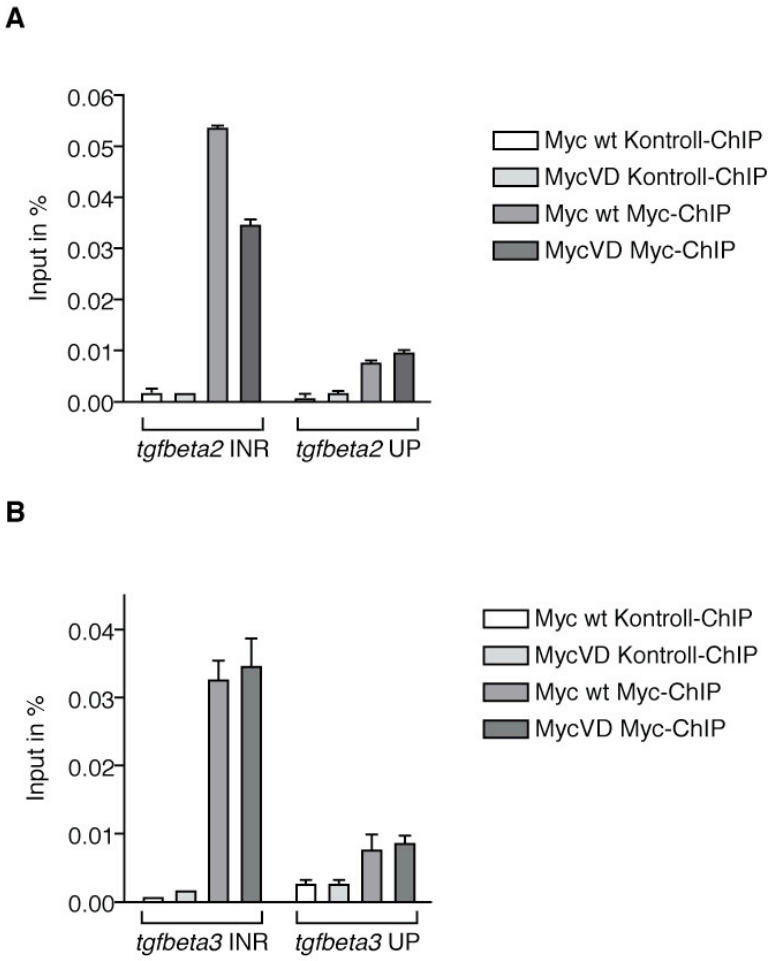


Abbildung 4.33: Myc bindet direkt an die Promotoren von *Tgfβ2* und *Tgfβ3*
ChIP Experimente aus Tumorproben dokumentieren die Anwesenheit beider Myc Varianten auf den Promotoren von *Tgfb2* (A) und *Tgfb3* (B), nicht aber innerhalb der Kontrollregion mehrere tausend Basen aufwärts des Promoters. Als Kontrollantikörper wurde ein unspezifischer Antikörper des Isotyps IgG verwendet

5 Diskussion

Die onkogene Stimulation primärer Zellen resultiert in einem Wachstumsvorteil gegenüber normal-proliferierenden Zellen. Dadurch erhöht sich das Risiko, Mutationen anzureichern und diese an Tochterzellen weiterzugeben. Das Phänomen der intrinsischen Tumorsuppression (Lowe *et al.*, 2004) erlaubt es dem Organismus, sich transformierten Zellen zu entledigen (Apoptose) oder dafür zu sorgen, dass sich diese nicht weiter vermehren (Seneszenz).

5.1 Die Relevanz der Interaktion von HectH9 und Mcl1 in der Myc-induzierten Apoptose

In ungestressten Zellen koordiniert die Expression von Myc intra- und extrazelluläre Programme und ist für die ordentliche Proliferation somatischer Zellen essentiell. Die Myc-gesteuerte Tumorgenese wird durch an onkogenes Myc gekoppelte Mechanismen der Apoptose und Induktion von p19Arf limitiert (Zindy et al, 1998; Eischen *et al.*, 1999). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass geringe Mengen an dereguliertem Myc ein stärkeres onkogenes Potential ausüben, da die Expression ausreichend ist, um die Proliferation zu erhöhen, der Schwellenwert um Apoptose auszulösen allerdings nicht erreicht wird (Murphy *et al.*, 2008).

5.1.1 Mcl1 spielt ein Rolle in der Myc-induzierten Apoptose

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Myc-induzierte Apoptose in Zellkultur untersucht werden. In der verwendeten Zelllinie der U2OS Zellen ist der *p14ARF* Lokus deletiert, p53 jedoch funktionell. Allerdings findet die Myc-induzierte Apoptose in diesem Zellsystem unabhängig von p53 statt (Michael Wanzel, persönliche Mitteilung). Zunächst konnte gezeigt werden, dass nach Induktion von Myc durch Zugabe von 4-OHT zum Zellkulturmedium nach einer proliferierenden Phase der apoptotische Signalweg eingeleitet wird (Abb. 4.1A und 4.1B). Merkmale der Apoptose konnten sowohl durchflusszytometrisch, in der Immunfluoreszenz und im Immunoblot sichtbar gemacht werden (Abb.4.1B,C und D). Durch eine unvoreingenommene Untersuchung von Regulatoren der Apoptose (pro- und antiapoptotisch) aus der Bcl2-Familie konnte für Mcl1 eine Änderung der Proteinmenge im Verlauf der Myc-induzierten Apoptose gezeigt werden (Abb.4.2B). Weder für die proapoptotischen Proteine Bim/Bod und Bax, noch für das antiapoptotische Protein Bcl2 konnte eine durch Myc-vermittelte Deregulierung innerhalb dieses Zellsystems nachgewiesen werden (Abb.4.2B). Die Abnahme des Proteinlevels von Mcl1 beruhte auf dem Mechanismus der proteasomalen Degradation, der sich durch die Inhibition des Proteasoms durch MG-132 hemmen ließ (Abb.4.3B). Ebenso durch apoptotische Stimuli wie

UVB/UVC und die Behandlung mit Methyl-Methansulfat wurde das Proteinlevel von Mcl1 vermindert (nicht gezeigt). Auch in ungestressten Zellen wurde Mcl1 schnell abgebaut wenn die Proteinsynthese durch Zykloheximid gehemmt war (Daten nicht gezeigt). Die kurze Halbwertszeit von Mcl1 unterscheidet das Protein von den ansonsten stabilen Mitgliedern der Bcl2-Proteinfamilie (Zhao *et al.*, 2007). Die mRNA-Mengen von *MCL1* hingegen bleiben nach Induktion von Myc weitgehend stabil und die Transkription wird eher verstärkt als erniedrigt (Abb.4.3A). Dies stimmt mit Beobachtungen überein, dass Mcl1 transkriptionell nach DNA-Schaden hochreguliert wird (Zhan *et al.*, 1997). Diese transkriptionelle Regulation wird durch die Aktivierung von Atm vermittelt (Jang *et al.*, 2010).

Im Prozess der intrinsischen Apoptose spielt Mcl1 eine wichtige Rolle am Mitochondrium. Mcl1 gehört den antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl2-Familie an (Kozopas *et al.*, 1993). Die größere prädominant gebildete Form des Proteins (auch $Mcl1_L$ genannt) enthält die charakteristischen BH-Domänen 1-3, aber entbehrt der BH4 Domäne, die innerhalb der Proteinsequenz von Bcl2 und $Bcl\text{-}_{XL}$ zu finden ist. Die Mitglieder der Bcl2-Proteinfamilie werden durch die Anwesenheit einer oder mehrerer BH-Domänen (*Bcl-2 homology domain*) charakterisiert (Kelekar *et al.*, 1998). Mcl1 enthält ebenfalls eine Transmembrandomäne (TM) die für die Lokalisierung in der äußeren Mitochondrienmembran benötigt wird. Darüberhinaus besitzt das Protein zwei PEST-Domänen, die charakteristisch für Proteine mit kurzer Halbwertszeit sind (Rogers *et al.*, 1986). Durch alternative Splicemechanismen entsteht eine zweite, kürzere Isoform ($Mcl1_S$) von Mcl1, die in ihrer Struktur mehr den proapoptotischen BH3-*only*-Proteinen ähnelt. In der Tat verstärkt die ektopische Expression von $Mcl1_S$ im Gegensatz zu $Mcl1_L$ das Auftreten der Apoptose (Bae *et al.*, 2000). Im Folgenden bezieht sich die allgemeine Bezeichnung Mcl1 auf die lange Form des Proteins.

In ungestressten Zellen hält Mcl1 das proapoptotische Protein Bak in einem inaktiven Status (Willis *et al.*, 2005). Bak ist ein lösliches monomeres Protein, das in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Apoptotische Stimuli veranlassen die Degradation von Mcl1 und dessen Dissoziation von Bak. Daraufhin kann Bak proapoptotisches Bax rekrutieren, woraufhin beide Proteine ihre Konformation ändern. Die Komplexe aus Bax und Bak bilden Poren in der Mitochondrienmembran aus, die zur Permeabilisierung der Membran und letztlich zur Freisetzung von Zytochrom C aus dem Mitochondrium führem. Es ist ebenfalls ein zweiter Mechanismus beschrieben bei dem Mcl1 mit BH3-*only*-Proteinen (tBid, Puma, Bim) heterodimerisiert und diese im ungestressten Zustand der Zellen vom Mitochondrium fernhält. Im Verlauf der Apoptose entfernt Noxa Mcl1 von diesen Aktivatoren, die daraufhin die Insertion und

Oligomerisierung von Bax in die äußere Mitochondrienmembran vermitteln können (Kim *et al.*, 2006).

Neben der Funktion in der direkten Regulation von Apoptose wurden für Mcl1 Interaktionen mit PCNA und Chk1 beobachtet, durch die die Proliferation und die Antwort auf DNA-Schaden moduliert werden (Fujise *et al.*, 2000; Germain und Duronio, 2007).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Degradation von Mcl1 im Laufe der Myc-induzierten Apoptose zur Aktivierung von Bak führt. Dies konnte mittels eines Antikörpers in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden, der nur den nach Dissoziation von Mcl1 exponierten N-Terminus des Proteins erkennt (Abb.4.4A). Darin gründet die Annahme, dass die Apoptose im Zellsystem der U2OS MycER Zellen über den intrinsischen Weg des Mitochondriums ausgelöst wird.

Die Erniedrigung des Proteinslevels von Mcl1 durch Anwendung der RNA-Interferenz-Technik durch selektionierbare shRNA-Vektoren resultierte in einer Erhöhung der Apoptoserate nach Induktion von Myc, nicht aber im ungestressten Zustand. Die bisher diskutierten Ergebnisse zeigen, dass der Proteingehalt an Mcl1 wichtig ist, um das Überleben einer Zelle zu gewährleisten und dass die Aktivierung von Myc zu einer Abnahme des Mcl1-Proteinsgehalts führt, der schließlich zu Apoptose führt.

5.1.2 Die E3 Ligase HectH9 katalysiert die für die Auslösung der Apoptose essentielle Degradation von Mcl1

Zhong und Kollegen identifizierten bereits 2005 ein Protein mit Namen Mule, das in der Lage ist, Mcl1 *in vitro* zu ubiquitinieren und abzubauen (Zhong *et al.*, 2005). Das gleiche Protein wurde als E3-Ligase von p53 und Myc identifiziert und trägt ebenfalls die Namen Arf-BP1 und HectH9 (Adhikary *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005).

HectH9 besitzt eine hochkonservierte BH3-Domäne, die für Interaktionen innerhalb der Mitglieder der Bcl2Familie essenziell ist. Mutationen innerhalb der BH3-Domäne vermindern die Fähigkeit an Mcl1 zu binden. Die BH3-Domäne von HectH9 ähnelt der BH3-Domäne in Bak. Da ebenso Bak mit Mcl1 interagiert (Cuconati *et al.*, 2003) ist vorstellbar, dass HectH9 nicht nur an freies Mcl1 bindet, sondern auch mit Bak um die Bindung an Mcl1 konkurriert (Chen *et al.*, 2005). Durch die schon bekannte Interaktion von Mcl1 und HectH9 lag die Vermutung nahe, dass HectH9 die Degradation von Mcl1 während der Myc-induzierten Apoptose verursacht. Mittels RNAi-Technik konnte gezeigt werden, dass die Apoptoserate in Zellen, deren Proteinlevel an

HectH9 herunterreguliert war, erheblich vermindert wurde (Abb.4.5). Dieser Effekt konnte für mehrerer shRNAs gezeigt werden und macht dadurch das Auftreten sequenzunspezifischer Nebeneffekte (*off-target-effects*) unwahrscheinlich. Auf Proteinebene konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Gehalt an Mcl1-Protein in HectH9-defizienten Zellen mit der verminderten Apoptoserate korreliert (Abb.4.5E). Hierbei ist ebenfalls anzumerken, dass die Verminderung der Menge an apoptotischen Zellen erst zu beobachten war, sobald die Zellen zur Apoptose stimuliert wurden, die Basallevel von gespaltenem Parp1 von Kontrollzellen und HectH9-depletierten Zellen waren gleich.

Die Doppeldepletion von HectH9 und seinem Substrat Mcl1 erhöhte die Apoptoserate gegenüber der Einfachdepletion von HectH9 (Abb.4.6). Dadurch konnte gezeigt werden, dass der Apoptose-reduzierende Effekt, der durch die Depletion von HectH9 ausgelöst wurde, zumindest partiell von der Anwesenheit von Mcl1 abhängt. Zu einer vollständigen Rückkehr zum apoptotischen Phänotyp wie in den Kontrollzellen kam es nicht, was daran liegen mag, dass die Depletion von HectH9 im Vergleich zur Depletion von Mcl1 auf Proteinebene wesentlich effektiver war (vgl. Abb.4.5B und Abb.4.4B) und demnach noch genügend Mcl1 in der Zelle verblieb, welches durch HectH9 vermittelt abgebaut werden konnte. Ausgehend von einer direkten Bindung von HectH9 an Mcl1, die sowohl exogen als auch endogen gezeigt werden konnte (Abb.4.8), vermittelte die E3-Ligase direkt die Ubiquitinierung am Substrat (Abb.4.7A). Die shRNA-vermittelte Reduktion von HectH9 hingegen verminderte die endogene Ubiquitinierung an Mcl1 (Abb.4.7B).

Zhong und Kollegen konstruierten eine mutante Form von Mcl1 in der alle Lysine mutiert wurden. Diese konnte *in vitro* nicht mehr von HectH9 ubiquitiniert werden (Zhong *et al.*, 2005). Eine *in vivo* Untersuchung zur Ubiquitinierung bestätigte dies, da weder durch endogenes noch transient exprimiertes HectH9 Modifikationen an der Mutante beobachtet werden konnten (Abb.4.9). Ausgehend von diesem Ergebnis wurden Zelllinien hergestellt, die entweder wildtyp Mcl1 (wt-Mcl1) oder mutiertes Mcl1 (Mcl1-mut) stabil exprimierten. Der Vergleich zu Kontrollzellen zeigte, dass die Ubiquitinierung von Mcl1 ein wichtiger Schritt in der Auslösung von Apoptose ist. Zellen, welche die mutierte Form von Mcl1 exprimierten, wurden vollständig geschützt vor Myc-induzierter Apoptose (Abb.4.10). Die Proteinmengen der mutanten Form von Mcl1 waren gegenüber Mcl1-wt erhöht, was jedoch nicht aus einer höheren Infektionseffizienz resultierte (Abb.4.10A). Im Gegensatz zu Mcl1-wt blieben diese über den Zeitverlauf der Myc-Induktion stabil (Abb.4.10D). Überraschend war, dass nur die mutierte Form von Mcl1 vor Myc-induzierter Apoptose schützt und Mcl1-wt ohne Effekt bleibt. In einem vergleichbaren Experiment, indem UVB als Apoptose-induzierende Substanz verwendet wurde, konnte gezeigt

werden, dass Mcl1-wt den Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen zumindest einem minimalen Schutz vor Apoptose bot (Daten nicht gezeigt). Damit konnte die Funktionalität des Konstrukts gewährleistet werden. Möglicherweise reichte die Expression des Mcl1-wt Konstrukts nicht aus (Abb.4.10D) um über einen längeren Zeitraum (5d) vor Apoptose zu schützen. In einer Studie von Stewart und Kollegen wurde gezeigt, dass Mcl1 auch unabhängig von der Ubiquitinierung proteasomal abgebaut werden kann. Hier wurde ebenfalls eine Lysin-freie Mutante des murinen Mcl1-Proteins konstruiert, welches sich in der Halbwertszeit von Mcl1-wt nicht unterscheidet und dementsprechend keinen erhöhten Schutz vor Apoptose im Vergleich mit Mcl1-wt bietet (Stewart *et al.*, 2010). Dies steht im Gegensatz zu Daten meiner Arbeit und den Beobachtungen von Zhong und Kollegen. Möglicherweise unterscheiden sich Regulations- und Degradationsmechanismen von murinem und humanem Mcl1 und es ist in Mäusen ein zweiter, von der Ubiquitinierung unabhängiger Abbauweg für Mcl1 vorhanden.

Als zweite Ubiquitin-E3-Ligase für Mcl1 wurde β-TRCP identifiziert. Zur Modifikation des Mcl1-Proteins benötigt β-TRCP die Phosphorylierung von Mcl1 durch GSK3β (Ding *et al.*, 2007). Eine Relevanz von β-TRCP in der Myc-induzierten Apoptose konnte durch RNAi vermittelte Inhibierung von β-TRCP nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

5.1.3 Durch Myc vermittelte Apoptose basiert auf der Induktion von DNA-Schaden

Im Laufe der UVB-induzierten Apoptose wurde Mcl1 abhängig vom Stress-auslösenden Stimulus ubiquitiniert (Abb.4.12). Dies lässt vermuten, dass die Bindung der Ubiquitin-E3 Ligase HectH9 an das Substrat Mcl1 abhängig vom DNA-Schaden zunehmen sollte. Daher wurden Zellen vor der Immunpräzipitation mit UVB bestrahlt und anschließend die Interaktion beider Proteine untersucht. Obwohl die Phosphorylierung von Atm und Chk1, zweier Proteine, die eine Schlüsselfunktion in der Weiterleitung der DNA-Schadenssignalkaskade innehalten, durch UVB verstärkt wurde, nimmt die Bindung von HectH9 an Mcl1 nicht zu (Abb.4.8B). Eine Erklärung dafür liefert möglicherweise die kürzlich identifizierte Deubiquitinase (DUB) Usp9X. Diese entfernt Ubiquitinketten von Mcl1 und erhöht damit die Stabilität des Proteins (Schwickart *et al.*, 2010). Usp9X revertiert somit die von HectH9 vermittelte Ubiquitinierung an Mcl1. In dieser Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass nach UV-Behandlung die Intensität der Mcl1-HectH9-Interaktion unverändert bleibt, der Stress-induzierende Stimulus allerdings die Interaktion von Usp9X zu Mcl1 schwächt. Dies lässt darauf schließen, dass die Degradation von Mcl1 weniger durch die Interaktion zu HectH9 als durch die Dissoziation von Usp9X reguliert

wird.

Im Zellsystem der U2OSMycER ist Myc in der Lage abhängig von seiner Aktivierung DNA-Schaden auszulösen. Dies konnte in einem Zeitverlaufsexperiment anhand der zunehmenden Phosphorylierung an H2A.X gezeigt werden (Abb.4.11). H2A.X ist ein direktes Substrat von Atm und wird nach dem Auftreten von Doppelstrangbrüchen phosphoryliert. Bei der DNA-Schadensantwort fungieren Atm und Atr als Sensoren, die das Signal eines DNA-Schadens erkennen und weiterleiten. Dabei wird Atm vorwiegend durch Doppelstrangbrüche aktiviert, Atr reagiert auf Einzelstrangbrüche und arretierte Replikationsgabeln. Nach deren Aktivierung werden weitere Kinasen wie Chk1 und Chk2 sowie p53 phosphoryliert. Die Aktivierung von p53 leitet abhängig von p21Cip1 einen Arrest in der G1-Phase ein. Die Phosphorylierung an Chk1 und Chk2 leitet eine Signalkaskade ein, die letztlich die Kontrollpunkte der G1/S- und G2/M-Phase aktiviert (Bartek und Lukas, 2003).

Die Fähigkeit von Onkogenen DNA-Schaden auszulösen und dadurch genetische Instabilität zu induzieren konnte mehrfach *in vivo* beobachtet werden. Dieser Tumor-suppressive Mechanismus ist vor allem für S-Phase-induzierende Onkogene beschrieben und es wurde eine direkte Beteiligung der Kinasen Atm und Atr gezeigt (Bartkova *et al.*, 2005). Wird die Stimulation der Proliferation, z.B. durch Expression eines Zellzyklusinhibitors wie p27Kip1, verhindert, so resultierte dies in einer Verminderung der durch Myc-induzierten Apoptoserate (Daten nicht gezeigt). Die onkogene Stimulation der Proliferation verursacht demnach die Induktion der Apoptose, möglicherweise durch fehlerhafte Bildung des Präreplikations-Komplexes oder kollabierten Replikationsgabeln.

Eine direkte Abhängigkeit der Apoptose von der Aktivität der Sensoren für replikativen Stress, konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden. Der durch die Atm/Atr Kinasen vermittelte Signalweg als Antwort auf DNA-Schaden kann durch Behandlung mit Inhibitoren gehemmt werden. In dieser Arbeit wurden zwei dieser Inhibitoren verwendet. Koffein hemmt die katalytische Aktivität von Atr und Atm kompetitiv (Sarkaria *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden dass die Behandlung mit Koffein Zellen vor Myc-induzierter Apoptose schützt (Abb.4.13). Dies stimmt mit mehreren publizierten Daten überein. Pusapati und Kollegen konnten zeigen, dass die durch Myc ausgelöste DNA-Schadensantwort *in vivo* durch Deletion von Atm unterdrückt wird und das Potential von Myc Apoptose zu induzieren damit geschwächt wird. Dieser Effekt ist spezifisch für Myc, da in Atm-defiziente Zellen eine vergleichbare Schadensantwort nach UV-Bestrahlung wie in Kontrollzellen ausgelöst werden kann (Pusapati *et*

al., 2006, Reimann *et al.*, 2007). Im Mausmodell begünstigt ein Atm-defizienter genetischer Hintergrund die Selektion auf hohe Mengen von Myc und führt zu verstärkter spontanen Ausbildung von Lymphomen (Pusapati *et al.*, 2006). Die heterozygote Deletion eines Kofaktors von Myc, Tip60, beschleunigt die Lymphogenese im EμMyc-Mausmodell. Dies resultiert aus einer verstärkten, Myc-abhängigen DNA-Schadensantwort und dem Verlust der Heterozygosität von p53 und/oder p19ARF. Weder die Myc- noch die p53-abhängige Transkription wird durch den Verlust eines Allels von *Tip60* beeinträchtigt (Gorrini *et al.*, 2007). Auch in dieser Studie konnte gezeigt werden, dass es sich um einen Myc-spezifischen Effekt handelt, da die DNA Schadensantwort von Tip60 defizienten Tieren nach IR vergleichbar zu Kontrolltieren blieb. Im Gegensatz zu Myc-induzierten Tumorgenese bleibt der Verlust von Atm in der Tumorentstehung, die aus der Inaktivierung von pRb resultiert, ohne Effekt auf die Apoptose und Tumorsuppression (Liao *et al.*, 1999).

Im Gegensatz zu Koffein konnte die Behandlung mit IGR (Isogranulatimid) keine deutliche Reduktion der Myc-induzierten Apoptose bewirken (Abb.4.13). IGR ist als G2-Phase Inhibitor beschrieben (Roberge *et al.*, 1998) und hemmt bereits in geringen Konzentrationen die Kinase Chk1 (Jiang *et al.*, 2004).

Die Kombination dieser Resultate weist darauf hin, dass nicht die generelle Hemmung der DNA-Schadensantwort für das Überleben der Zellen nach Aktivierung von Myc verantwortlich ist. Es scheint wichtig, dass die Inhibition auf der Ebene der Sensoren von DNA-Schaden, nämlich Atm und Atr stattfindet. Eine mögliche Erklärung dafür liefern Studien, die HectH9 als Substrat von Atm und Atr identifizierten und validierten (Matsuoka *et al.*, 2007; Mu *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass Atm und HectH9 miteinander interagieren, nachdem Atm durch Phosphorylierung aktiviert wurde. Zusammen mit den Daten aus meiner Arbeit führt dies zur Hypothese, dass HectH9 nach Myc-induziertem DNA-Schaden durch Atm/Atr aktiviert wird und daraufhin die Ubiquitinierung an Mcl1 einleitet. Ist die Aktivität von Atm/Atr gehemmt, wird Mcl1 nicht von HectH9 ubiquitiniert und bleibt in Folge dessen stabil. Wenn durch einen zweiten Kontrollmechanismus bedingt die Deubiquitinligase Usp9x von Mcl1 dissoziiert ist, wird Mcl1 abgebaut und die Zellen gehen in Apoptose.

Eine Fragestellung, die im Laufe dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte, befasst sich mit der Lokalisierung von HectH9. Es kann vermutet werden, dass HectH9 sich abhängig von potentiellen Phosphorylierungen vom Nukleus ins Zytoplasma bewegen kann, um Mcl1 am Mitochondrium zu ubiquitinieren. Ein Lokalisationswechsel von HectH9 ist wahrscheinlich, da

sich einige Substrate nachweislich in Nukleus befinden (c-Myc, N-Myc, p53, Cdc6, Histone) und HectH9 aus nukleären Extrakten isoliert werden konnte (Mu *et al.*, 2007). In eigenen Fraktionierungsversuchen konnte HectH9 allerdings ausschließlich im Zytoplasma nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt) und Immunfluoreszenzen von exogenem HectH9 bestätigen dies (Zhao *et al.*, 2009). Um diese Problematik zu lösen empfiehlt es sich, Antikörper zu entwickeln, die endogenes HectH9 immunzytochemisch erkennen um die eventuelle Mobilität des Proteins zu dokumentieren.

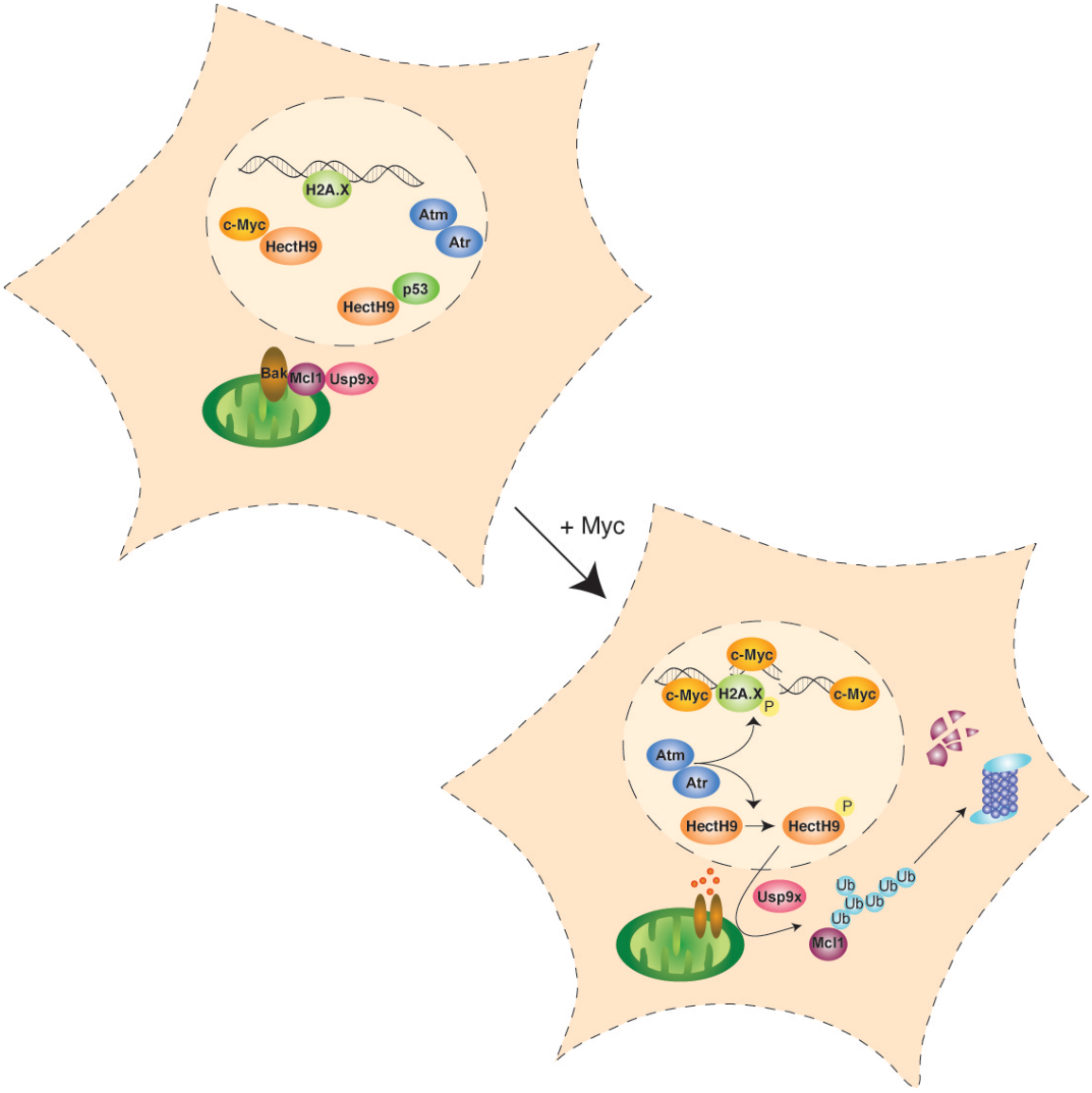


Abbildung 5.1: Modell zur Vermittlung der Myc-induzierten Apoptose über die Interaktion von HectH9 zu Mcl1
In einer Zelle mit physiologischen Myc-Leveln liegt HectH9 im Zellkern mit Myc, p53 oder weiteren Substraten assoziiert vor. Mcl1 bildet in der Mitochondrienmembran einen Komplex mit Bak, wodurch letzteres im inaktiven Status gehalten wird. Steigen die Mengen an Myc-Protein über den Normalwert

hinaus an, beginnt eine vermehrte Proliferation und Myc induziert direkt DNA-Schaden. Dadurch werden die Kinasen Atm und Atr aktiviert, die ihrerseits H2A.X und HectH9 phoshorylieren. Aktiviertes HectH9 wird durch einen bisher unbekannten Mechanismus aus dem Zellkern zu den Mitochondrien transportiert, wo es Mcl1 durch Ubiquitinierung für den proteasomalen Abbau markiert. Sobald Usp9x von Mcl1 dissoziiert, wird Mcl1 vom Mitochondrium entfernt und Bak bildet eine Pore in der Mitochondrienmembran, die den Austritt von Zytochrom C in das Zytoplama erlaubt. Zytochrom C aktiviert eine Signalkaskade, die letztlich zum Tod der Zelle führt.

5.1.4 Inhibition von HectH9 als möglichen Therapieansatz

In der Studie von Chen *et al.* wurde HectH9 (hier Arf-BP1, *Arf binding protein 1*) als Interaktionspartner von p14Arf und p53 identifiziert (Chen *et al.*, 2005). HectH9 ubiquitiniert p53 und leitet dadurch dessen Degradation ein. Dieser Prozess kann durch die Interaktion von Arf mit HectH9 inhibiert werden. Die Inhibition von HectH9 führt zu einem Zellzyklusarrest. Dieser ist einerseits p53-abhängig, konnte aber auch in p53-defizienten Zellen beobachtet werden und im Rahmen meiner Arbeit bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Als mögliches Zielprotein von HectH9 in p53-defizienten Zellen könnte Myc eine Rolle spielen. Interessanterweise beobachteten Chen und Kollegen eine erhöhte Apoptose in HectH9-depletierten, ungestressten U2OS Zellen, welche in Kontrollzellen nicht beobachtet werden konnte (Chen *et al.*, 2005). Dies wird dadurch erklärt, dass die Stabilisierung von p53 durch den Verlust von HectH9 zu einer transkriptionellen Induktion von *p21Cip1* und proapoptotischem *Bax* führt, die sowohl Zellzyklusarrest als auch Apoptose zur Folge hat. Demgegenüber stehen Resultate meiner Arbeit und der Studie von Zhong *et al.* in der Mcl1 als Substrat von HectH9 (hier Mule) identifiziert wurde (Zhong *et al.*, 2005). Die Behandlung von HectH9-depletierten Zellen mit Apoptose-auslösenden Substanzen wie UV, Ektoposid und Cisplatin hat eine Reduktion der Apoptose im Vergleich mit Kontrollzellen zur Folge (Zhong *et al.*, 2005). Diese resultiert aus einer Stabilisierung von Mcl1, die Zellen vor Apoptose schützt und wurde im Rahmen meiner Arbeit bestätigt. Die Diskrepanz der Ergebnisse von Chen *et al.* und Zhong *et al.* in Bezug auf die Veränderung der Apoptoserate durch eine Herunterregulation von HectH9 lässt sich nicht leicht erklären. Genauso wie in meiner Arbeit wurden in beiden Studien das gleiche Zellsystem (U2OS) verwendet. Demnach können zellspezifische Unterschiede diesen Effekt nicht erklären. Ein möglicher Ansatz bietet die Tatsache, dass der Apoptose-auslösende Effekt einer HectH9-Depletion in ungestressten Zellen beobachtet wurde, wohingegen die Reduktion der Apoptose erst nach Behandlung mit Apoptose-induzierenden Substanzen, wie der Aktivierung von Myc, auftrat (Abb.4.5) (Zhong *et al.*, 2005). Möglicherweise ist HectH9 in ungstressten Zellen für die strikte Kontrolle des p53-Basallevels zuständig und löst Apoptose erst in Stresssituationen aus. Eine damit eng verknüpfte Erkenntnis ist die Tatsache, dass die Ubiquitinierung von p53 im Zellkern stattfinden muss wohingegen Mcl1 in der Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Somit müsste für die Regulation dieser beiden

unterschiedlichen Substrate ein Lokalisationswechsel von HectH9 vorgenommen werde. Dennoch stellt sich die Frage, warum ein Protein zwei Substrate modifiziert, deren Aktivität einen unterschiedlichen Ausgang nimmt. Diese Beobachtung ist allerdings nicht so kontrovers, wie sie zunächst scheint. Denn wie schon in Abschnitt 5.1.1 behandelt, stellt der *MCL1*-Genlokus durch alternative Splicemechanismen zwei Proteine her, $Mcl1_S$ und $Mcl1_L$ (Bae *et al.*, 2000), die jeweils gegensätzliche Effekte auf die Apoptose ausüben. Da HectH9 die BH3-Domäne von Mcl1 bindet, ist es wahrscheinlich, dass ebenso $Mcl1_S$ von HectH9 ubiquitiniert und zum Abbau geleitet werden könnte (Shmueli und Oren, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte im U2OS Zellsystem eine Beteiligung von p53 an der Myc-induzierten Apoptose ausgeschlossen werden (Abb.4.5E). Zwar waren die, wie nach Chen *et al.* zu erwarten, p53-Proteinlevel nach der Depletion von HectH9 deutlich erhöht, trotz dessen wurde das Apoptoselevel im Vergleich zu Kontrollzellen reduziert. Ebenso schien p53 in diesem Zellsystem nicht aktiv beziehungsweise aktiviert zu sein, da sich weder die Basallevel über den Zeitverlauf der Myc-Aktivierung hinweg veränderten, noch die Phosphorylierung am Ser15 von p53 durch Myc induziert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Myc wird durch HectH9 in einer Lysin63-Verknüpfung polyubiquitiniert. Dadurch werden die transkriptionellen Eigenschaften von Myc erhöht (Adhikary *et al.*, 2005). Die durch RNAi vermittelte Inhibition von HectH9 vermindert die Myc-abhängige Genaktivierung und antagonisiert den durch Myc vermittelten Anstieg der Proliferation. In Tumorzellen löst die Depletion von HectH9 eine Akkumulation der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus aus (Adhikary *et al.*, 2005). Letzteres konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da durch Depletion von HectH9 eine Verzögerung durch alle Phasen des Zellzyklus beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt). HectH9 ist in einer Vielzahl humaner Tumore verstärkt exprimiert und die Schwere des Krankheitsverlaufs korreliert mit der Expression des Proteins. Dieser Zusammenhang konnte für eine Vielzahl primärer Tumore gezeigt werden, in denen auch die Expression von Myc bekanntermaßen eine Rolle spielt (Adhikary *et al.*, 2005). Von den Autoren wurde es allerdings eine direkte Beziehung von Myc, oder dementsprechend der Aktivität von Myc und der Expression von HectH9 in primären Tumoren nicht nachgewiesen. Daher ist zumindest der Bezug beider Proteine *in vivo* nicht ganz geklärt. Die Autoren postulieren dennoch, dass HectH9 sich als pharmazeutisches Ziel anbietet, um durch dessen Inhibition die Myc-induzierte Tumorgenese zu lindern.

Eine generelle Inhibition von HectH9 zur pharmazeutischen Therapie von Myc-gesteuerten Tumoren verbirgt einige Schwierigkeiten. Ungeachtet des Effekts, den HectH9 auf N-Myc ausübt,

ist der biologische Effekt einer Inhibition von HectH9 strittig. Die Inhibition von HectH9 resultiert zum einen in einem Mechanismus, der durch Verminderung der Apoptoserate infolge der Stabilisierung von Mcl1 die Tumorentstehung begünstigt. Zum anderen kann eine dadurch bedingte Verringerung der Aktivität von Myc, beziehungsweise Stabilisierung von p53, die Tumorgenese limitieren. Da diese biologischen Wirkungen im groben Gegensatz zueinander stehen ist eine Inhibition von HectH9 nur dann sinnvoll, wenn gewährleistet ist, dass der Tumor-suppressive Mechanismus der Myc-induzierten Apoptose nicht inhibiert wird.

Demnach eignet sich die Inhibition von HectH9 in einem Tumormodell, indem die Tumorgenese nicht durch Myc-induzierte Apoptose limitiert wird. In einer Studie von Pelegaris und Kollegen wurde in einem transgenen Mausmodell die durch Myc-vermittelte Ausprägung von Hautkrebs beobachtet. Die Aktivierung von Myc resultiert nach einem schnellen Anstieg der Proliferation innerhalb der suprabasalen Epidermis, in der Ausbildung von Papillomen. Merkmale der Myc-induzierten Apoptose konnten nicht beobachtet werden, was damit zu erklären ist, dass diese durch die Anwesenheit externer Überlebensfaktoren unterdrückt wird (Pelengaris *et al.*, 1999). Im humanen und murinen Hautkrebs liegt p53 mit hoher Frequenz inaktiviert vor (Campbell *et al.*, 1993). Weiterhin wurden veränderte Expressionslevel von Myc beobachtet (Pelisson *et al.*, 1992; Sawey *et al.*, 1987) und dem Myc-Zielgen Ornithin-Decarboxylase eine Rolle in der Entwicklung von Hautkrebs zugeschrieben (Weeks *et al.*, 1982). Die Hemmung von HectH9 in diesem Tumormodell würde demnach eine Stabilisierung von p53, sowie Verminderung der Aktivität von Myc nach sich ziehen, ohne antiapoptotische Nebeneffekte zu begünstigen.

Weiterhin könnte eine Inhibition von HectH9 mit gleichzeitiger Inhibition von Mcl1 ein erfolgversprechender Ansatz für Therapien sein. Dies führt zu einem erhöhten Auftreten von Apoptose (Andersson *et al.*, 2004), wie bereits im Zellkulturexperiment gezeigt werden konnte (Abb.4.6) und korreliert gleichzeitig mit einer verminderten Myc-Aktivität.

5.1.5 Therapeutische Inhibition von Mcl1

Mcl1 ist ein essenzieller antiapoptischer Faktor, der eine Rolle in der Entwicklung und Differenzierung normaler Zellen hat. Die Deregulation des *MCL1*-Lokus resultiert oft in einer verstärkten Transkription, die an der Ausbildung humaner Krankheiten und bösartiger Tumore beteiligt ist. Eine erhöhte Expression von Mcl1 konnte in einer Vielzahl humaner hämatopoetischer Krebsarten, Lymphomen und solider Tumore festgestellt werden (Aichberger *et al.*, 2005; Cho-Vega *et al.*, 2004; Derenne *et al.*, 2002). Weiterhin scheint die Expression von Mcl1 in einigen Krebsarten zu einer Resistenz gegenüber konventioneller Therapien zu führen

(Nguyen *et al.*, 2007; Paoluzzi *et al.*, 2008). Die Verminderung der Expression von Mcl1 erhöht die Apoptoserate in Krebszellen, was darauf hin deutet, dass Mcl1 sich als therapeutisches Ziel anbietet (Andersson *et al.*, 2004). Die antiapoptotische Funktion von Mcl1 kann auf mehreren Ebenen durch Therapeutika gestört werden:

STAT-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die in Tumoren oft konstitutiv aktiv sind. Sie regulieren unter anderem auch die Transkription von Mcl1. Die Inhibition von STATs durch synthetische und natürliche Verbindungen wie Resveratrol führt zur Herunterregulation von Mcl1 (Kotha *et al.*, 2006), hat allerdings eine Vielzahl unspezifischer Nebeneffekten.

Da sowohl die mRNA als auch das Protein von Mcl1 eine geringe Halbwertszeit haben, führt eine kurzfristige Inhibition der Transkription, durch Inhibitoren der CKIs wie Seliciclib, zu einer Herunterregulation der Mcl1 mRNA-Menge (MacCallum *et al.*, 2005). Durch Hemmung der Translation durch Sorafenib oder andere Verbindungen verringert sich die Proteinexpression von Mcl1 (Andersson *et al.*, 2004; Kuroda *et al.*, 2008; Rahmani *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2006).

In Prostatazelllinie konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Ibuprofen die Splicemechanismen des Mcl1-Transkripts verstärkt und dadurch die Bildung der proapoptotischen $Mcl1_S$-Isoform begünstigt. Dadurch werden diese Zellen zu vermehrter Apoptose angeregt (Kim, 2008).

Neben den bisher beschriebenen Pharmazeutika befinden sich auch spezifische Inhibitoren für Mcl1 auf dem Markt. Agenzien, die der BH3-Domäne der proapoptotischen Bcl2-Proteine ähneln können antiapoptotische Proteine neutralisieren, indem sie innerhalb der hydrophoben Furche binden (Kim *et al.*, 2006; Willis *et al.*, 2005). Ein synthetisches Imitat der BH3-Domäne, Obatoclax bindet Mcl1 selektiv und stört die Interaktion von Mcl1 zu Bak (Nguyen *et al.*, 2007), was die Zellen für Apoptose sensibilisiert.

5.1.6 Möglichkeiten zur Inhibition der Myc-Aktivität

Myc bietet nur unter Vorbehalt ein gutes Ziel für pharmazeutische Therapie. Als Transkriptionsfaktor vermittelt Myc seine Hauptaktivität durch Protein-Protein-Interaktionen. Es ist bereits bekannt, dass entsprechende Wechselwirkungen schlecht durch chemische Moleküle angreifbar sind. In vielen humanen Tumoren ist nicht eine Mutation von Myc selbst ausschlaggebend für das onkogene Potential, sondern entsteht erst in zweiter Instanz durch übergeordnete Signale. Letztlich sind sowohl N- als auch c-Myc essentiell für die Proliferation somatischer Zellen, trotz der Gefahren, die von einer Deregulation der Proteine ausgehen. Durch

die regulierbare Expression einer dominant negativen Form von Myc (Omomyc), die die Aktivität der drei onkogenen Myc-Proteine durch Dimerisierung inhibiert, konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von onkogenem Myc essentiell ist, um Lungentumore zu induzieren und zu erhalten. Die Inaktivierung von Myc in adulten Mäusen resultierten nur in sich schnell erneuernden Geweben, wie Haut, Dünndarm und Hoden in mangelnder Proliferation. Diese Effekte ließen sich durch Abschalten von Omomyc revertieren (Soucek *et al.*, 2008). Die Inaktivierung von Myc in hämatopoetischen Geweben führt zu einer anfänglichen Anämie und Leukozytopenie, die allerdings selbständig verschwindet.

Da Myc selbst keine katalytische Aktivität besitzt, bietet es sich einerseits an, Interaktionen von Myc zu wichtigen Kofaktoren wie zum Beispiel Max zu unterbinden (Hammoudeh *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2007). Ein erfolgversprechenderer Ansatz ist die Identifizierung von Genen, die mit Myc nur in einem bestimmten Signalweg kooperieren. So konnte zum Beispiel in einem Hochdurchsatz-*screen* Ark5 gefunden werden, dessen RNAi-vermittelte Depletion zur synthetischen Letalität in Myc-überexprimierenden Zellen führt. Da Ark5 eine Kinase ist, lässt sich ihre enzymatische Aktivität durch *small molecules* inhibieren (Lidan Liu, persönliche Mitteilung).

5.1.7 Kooperation von Myc und Mcl1

Alle sechs Mitglieder der antiapoptotischen Bcl2-Familie kooperieren mit Myc in der Ausbildung von myeloischer Leukämie. Die Expression der Proteine zusammen mit einer Überexpression von Myc resultiert in einer beschleunigten Tumorgenese im Vergleich zu Kontrolltieren. Dabei konnten die Bcl2-Protein die Proliferationsrate nicht steigern und die schnelle Tumorprogression ist auf eine erhöhte Apoptoserate zurückzuführen (Beverly und Varmus, 2009).

Die erhöhte Expression von Proteinen aus der Bcl2-Familie vermittelt eine Resistenz gegenüber herkömmlichen Chemoterapeutika (Johnstone *et al.*, 2002). Daher ist es von Interesse innovative therapeutische Strategien zu entwickeln, die vermehrt auf die Inhibition der antiapoptotischen Proteine abzielen. In einer kürzlich erschienen Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression von Myc und Mcl1 in der Ausbildung muriner akuter myeloischer Leukämie (AML) miteinander kooperieren (Xiang *et al.*, 2010). Zum einen stellten die Autoren fest, dass sowohl in humanen als auch in murinen Tumorproben die erhöhte Expression von Mcl1 (die nicht transkriptionell, aber dennoch durch Myc indirekt beeinflusst) offenbar der Myc-induzierten Apoptose entgegenwirkt und dadurch die Tumorgenese beschleunigt. Zum anderen wurde beobachtet, dass Myc bei Anwesenheit von Mcl1 einen rapiden Krankheitsverlauf der AML induziert, dieser allerdings bei

Haploinsuffizienz von Mcl1 signifikant verzögert wird. Ebenso in sekundär rezipienten Mäusen resultiert die Deletion eines Allels des *MCL1*-Lokus in einer verlängerten Lebensdauer.

5.2 Die Interaktion von Myc und Miz1 unterdrückt die TGFβ-induzierte Seneszenz *in vivo*

Um die Auswirkung der reprimierenden Funktion von Myc im Laufe der Tumorgenese zu untersuchen, wurde eine Mutante von Myc konstruiert, die die Fähigkeit zu Interaktion mit Miz1 und dadurch zur Repression von Zielpromotoren verloren hat (Herold *et al.*, 2002). Bereits im Vorfeld dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Einsatz dieser Mutante MycV394D im Mausmodell die Tumorentstehung im Vergleich zu wildtypischem Myc (Myc-wt) verzögert und dies mit erhöhten Mengen an *p15Ink4b*-spezifischer mRNA korreliert (Tobias Otto, persönliche Mitteilung).

5.2.1 MycV394D-exprimierende Tumore erfüllen drei Merkmalen der onkogenen Seneszenz vollständig

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der Einsatz der Punktmutante MycV394D die Ausprägung der Seneszenz begünstigt und dies mit einem limitierten Tumorwachstum korreliert.

Zelluläre Seneszenz ist definiert als ein Mechanismus, der zu einem irreversiblen Zellzyklusarrest führt, bei dem der Stoffwechsel der Zellen allerdings aktiv bleibt (d'Adda di Fagagna, 2008). Man unterscheidet die replikative Seneszenz von der Onkogen-induzierten Seneszenz (OIS, *oncogene induced senescence*).

Die replikative Seneszenz resultiert aus einer Verkürzung der Telomere in somatischen Zellen und ist eng mit dem Alterungsprozess von Zellen verknüpft (Dimri *et al.*, 1995). Funktionelle Telomere bewahren die Integrität und Stabilität des Genoms und schränken damit die Tumorgenese ein. Zellen, die die Fähigkeit verloren haben, im Zellzyklus zu arretieren, proliferieren trotz der dysfunktionalen Telomere und häufen chromosomale Abnormalitäten an, die letztlich zu maligner Transformation führen können (Artandi und DePinho, 2000).

Die onkogene Seneszenz wird als Antwort auf Onkogen-induzierten DNA-Schaden und reaktive Oxygenspezies (ROS; *reactive oxygen species*) ausgelöst und als Tumor-suppressiver Mechanismus diskutiert (Michaloglou *et al.*, 2005). Die Induktion von Seneszenz ist assoziiert mit der Akkumulation von p53, p16Ink4a (Serrano *et al.*, 1997) und p15Ink4b (Collado *et al.*, 2005).

Die p53-abhängige onkogene Seneszenz kann durch physiologische Stimuli nicht revertiert

werden. Die experimentelle Manipulation von p53 bewirkt allerdings den Wiedereintritt von seneszenten Zellen in den Zellzyklus (Beausejour *et al.*, 2003). In einer Studie von di Micco und Kollegen konnte gezeigt werden, dass die ektopische Expression des Onkogens Ras in primären Zellen zunächst die DNA-Schadensantwort auslöst. Nach Aktivierung von Atm und Atr und einer initialen Phosphorylierung von H2A.X werden schließlich sowohl Chk1 und Chk2, als auch p53 phosphoryliert. Letzteres induziert die Transkription von *p21Cip1* und *p16Ink2a* (Di Micco *et al.*, 2006). Die Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS; *oncogene induced senescence*) kann assoziiert mit der Auslösung von DNA-Schaden und der vollständigen Aktivierung der DNA-Schadenskaskade auftreten und schränkt die Proliferation beschädigter Zellen ein. Des Weiteren kann auch die Induktion von p19Arf und die dadurch vermittelte Stabilisierung von p53 die zellulärer Seneszenz auslösen (Kamijo *et al.*, 1997).

Soweit bislang bekannt verläuft die p53-unabhängige Seneszenz über den pRb (*retinoblastoma protein*)-Signalweg. Der Tumorsuppressor pRb verhindert die Proliferation beschädigter Zellen durch die Inhibierung der Zellzyklus-stimulierenden Transkriptionsfaktoren aus der E2F-Familie (Weinberg, 2007). Dabei sind die Cdk-Inhibitoren p16Ink4a oder p15Ink4b beteiligt. Diese hemmen den Cdk4/6-Zyklin D-Komplex, woraufhin die Phosphorylierung an pRb verhindert und in dessen Folge der Übergang von G1- zur S-Phase durch freies E2F unterbunden wird. Bedingt durch die pRb abhängige Bildung von Heterochromation an Promotoren der E2F-Zielgene und damit verbundener Modulation der Chromatinstruktur kann die durch p16Ink4a- oder p15Ink4b-vermittelte Seneszenz nicht revertiert werden (Beausejour *et al.*, 2003). Neben molekulargenetischen Charakteristika, weisen seneszente Zellen typische zellbiologische Eigenschaften in Form von SAHFs auf (*senescence-associated heterochromatic foci*) auf, die aus Acetylierung und Methylierung von Histonen resultieren (Braig *et al.*, 2005; Narita *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2007).

In MycV394D-exprimierenden Tumoren werden 3 der 4 Bedingungen, die auf seneszente Zellen zutreffen, vollständig erfüllt (Mooi und Peeper, 2006).

1. Im Gewebe wird die Expression eines Onkogens hochreguliert

In Abwesenheit von Doxyzyklin werden Myc-wt und MycV394D unter der Kontrolle des tet-Operators konstitutiv exprimiert. Da beide Proteine im prämalignen Zustand vergleichbar exprimiert werden und da MycV394D sich in seiner Transformationseffizienz nicht von Myc-wt unterscheidet, kann MycV394D als gleichwertiges Onkogen angesehen werden (Patel und Mahon, 2006).

2. Die Proliferationsrate der Zellen ist eingeschränkt

Als erster Marker zum Nachweis für die Proliferation wurde zunächst Ki67 verwendet, wobei kein Unterschied zwischen Myc-wt und MycV394D-exprimierenden Tumoren festgestellt werden konnte (Tobias Otto, persönliche Mitteilung). Dies traf ebenfalls für den Vergleich weiterer Zellzyklusproteine zu. Zumindest für Ki67 und PCNA ist bekannt, dass es sich hierbei um Proteine handelt, die als direkte Zielgene von Myc beschrieben wurden (Fernandez *et al.*, 2003). Da die Transaktivierung von MycV394D im Vergleich zu Myc-wt unverändert bleibt, kann dies als Erklärung dafür dienen, dass einige der verwendeten Marker keine verlässliche Aussage über die Myc-vermittelte Proliferation gaben. Daher wurde als weiterer Marker die Inkorporation von BrdU untersucht. Durch die Anwendung dieser Methode konnte eine deutlich verminderte Proliferation in MycV394D-exprimierenden Tumoren ermittelt werden (Abb.4.16). Zur genaueren Charakterisierung des proliferativen Defekts wurde mit Cdk1 (Cdc2) die Expression eines weiteren Zellzyklusmarkers untersucht. Die von Myc-wt gesteuerten Tumore zeigten eine deutlich erhöhte Expression von Cdk1 im Vergleich zu MycV394D gesteuerten Tumoren und nicht-transgenen Thymi (Abb.4.18). Die Aktivierung von Cdk1 und dessen Bindung an Zyklin B ist essentiell für die Progression durch die G2-Phase des Zellzyklus (Draetta und Beach, 1988; Riabowol *et al.*, 1989). Die Proteinmengen von Zyklin B variierten innerhalb der untersuchten Proben, es konnte jedoch kein Unterschied zwischen den beiden Tumorgruppen festgestellt werden. Die Aktivität von Cdk1 wird durch Phosphorylierungen und Dephosporylierungen gesteuert. Die inhibitorischen Phosphorylierungen finden an den Tyrosinen 14 und 15 statt (Atherton-Fessler *et al.*, 1994; Timofeev *et al.*, 2010). Die Phosphorylierung an Tyr15 wird durch die Wee1 Kinase katalysiert und durch Cdc25 zur Aktivierung vor dem Eintritt in die Mitose entfernt (Strausfeld *et al.*, 1991). Die verminderte Expression von Cdk1 in MycV394D-exprimierenden Tumoren ist ein Anzeichen dafür, dass ein korrekter Eintritt der Zellen in die Mitose nicht gewährleistet werden konnte und dass auf Grund der Anreicherung von phosphoryliertem Protein, Cdk1 in MycV394D-exprimierenden Tumoren nicht funktionell zu sein schien (Abb. 4.18). Übereinstimmend mit diesen Daten konnte ebenfalls eine erhöhte Expression des Zellzyklusinhibitors p27Kip1 beobachtet werden (Tobias Otto, persönliche Mitteilung). P27Kip1 blockiert die Progression durch den Zellzyklus am Übergang von G1- zur S-Phase.

3. Die Expression eines Tumorsuppressors ist verstärkt

Zur Untersuchung des p53-vermittelten Signalweges und der DNA-Schadenssignalkaskade in unserem Mausmodell wurden Proteinlysate zunächst auf die Stabilisierung von p53 sowie dessen

Phosphorylierungsstatus überprüft. Es ist unwahrscheinlich, dass die Aktivierung von p53 oder p19Arf die Ausprägung der Seneszenz in MycV394D-exprimierenden Tumoren stimuliert, da innerhalb der Tumorgruppen keine veränderte Regulierung beziehungsweise Evidenz für eine Inaktivierung beobachtet werden konnte (Abb. 4.21 und Tobias Otto, persönliche Mitteilung). Ebenfalls lag keine Phosphorylierung am Ser345 von Chk1 vor, welches als Marker für replikativen Stress gilt. Der DNA-Schaden in Tumoren unseres Mausmodells ist somit insgesamt gering (Tobias Otto, persönliche Mitteilung).

Die Analyse der Zellzyklusinhibitoren auf Transkriptionsebene ergab eine signifikante Erhöhung der *p15Ink4b*-Menge in den MycV394D-exprimierenden Tumoren im Vergleich zu Myc-wt (Abb.4.22 und Tobias Otto, persönliche Mitteilung). Allgemein war *p15Ink4b* in den Tumoren im Vergleich zu Thymi erhöht. Dieses Ergebnis konnte sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene bestätigt werden. Ebenfalls für den Zellzyklusinhibitor *p57Kip2* zeigte sich eine unterschiedliche Regulation innerhalb der Tumore unterschiedlichen Genotyps (Tobias Otto, persönliche Mitteilung). Daraus lässt sich schließen, dass die Seneszenz in MycV394D-exprimierenden Tumoren über den pRb-Signalweg und nicht durch p53 vermittelt ausgelöst wird.

4. Anstelle von Seneszenz-assoziierter β-Galaktosidase zeigen sie eine deutlich positive Färbung im H3K9triMe

Zur zellbiologischen Untersuchung der Seneszenz wurde zunächst eine SA-β-Gal-Färbung durchgeführt. Diese Methode ist etabliert zu Detektion seneszenter Zellen und Gewebe (Dimri *et al.*, 1995) und macht die Akkumulation saurer β-Galaktosidase durch eine blaue Färbung sichtbar. Das Resultat des Vergleichs von Myc-wt- und MycV394D-exprimierenden Tumoren erbrachte keinen signifikanten Unterschied innerhalb beider Genotypen, wohl aber eine Tendenz in Richtung einer Anhäufung blauer Zellen in MycV394D-exprimierenden Tumoren (Tobias Otto, persönliche Mitteilung). Als zweiter Marker diente die Trimethylierung am Lysin 9 des Histons 3. Hier konnte eine deutliche Akkumulation positiv–gefärbter Zellen in MycV394D-exprimierenden Tumoren im Vergleich zu Myc-wt-exprimierenden Tumoren beobachtet werden (Abb.4.19). Die Präparate von MycV394D-exprimierenden Tumoren wiesen einen hohen Anteil H3K9triMe und Ki67 doppelt-positiv gefärbter Zellen auf. Dies deutet daraufhin, dass die Interaktion von Myc und Miz1 zwar nötig ist, um die Ausbildung der Seneszenz zu umgehen, sie allerdings keinen Einfluss auf die Expression des durch Myc aktivierten Zielgens Ki67 hat. Die MycV394D-exprimierenden Zellen haben offensichtlich den Zellzyklus nicht vollständig verlassen, zeigen aber Anzeichen eines seneszenten Phänotyps, der allerdings nicht durch alle etablierten Marker

bestätigt werden konnte. Ob die entsprechenden Zellen nun eine vollständige Seneszenz ausbilden blieb daher unklar.

In weiteren *in vivo* Studien konnte gezeigt werden, dass der Mechanismus der Seneszenz ein physiologischer Prozess ist, der mutierte Zellen vor der Transformation schützt. Nevi beispielsweise resultieren aus einer Akkumulation von Melanozyten, die eine Mutation innerhalb eines Onkogens (BRAF) tragen, dennoch über Jahrzehnte in einem arretierten Zustand verharren können. Dieser Zustand wird begleitet von einer erhöhten Expression des Zellzyklusinhibitors p16Ink4a und Seneszenz (Michaloglou *et al.*, 2005). In transgenen Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Suv39h, einer Methyltransferase, die Histon H3 am Lysin 9 (K9) trimethyliert und damit eine Andockstelle für HP1 zur Vorstufe der Ausbildung von Heterochromatin schafft, sowohl für Ras- als auch für Myc-induzierte Tumore die Tumorprogression in Folge einer verminderten Ausbildung von Seneszenz verstärkt (Braig *et al.*, 2005; Reimann *et al.*, 2010). Die Trimethylierung des Histons tritt in der Seneszenz verstärkt an Promotoren von E2F1-Zielgenen auf. Diese werden dadurch stillgelegt und die Zelle arretiert (Narita *et al.*, 2003). In einer weitere Studie konnte *in vivo* die Ausbildung von Seneszenz in prämalignen Tumoren beobachtet werden, nicht jedoch in malignen (Collado *et al.*, 2005). Zusammenfassend deutet dies darauf hin, dass das Auftreten der Seneszenz die Tumorprogression einschränkt und eine suppressive Barriere in der Entwicklung von Tumoren darstellt. Dennoch werden hier gegenteilige Beobachtungen diskutiert. Seneszente Zellen sekretieren inflammatorische Zytokine, die offenbar benachbarte Zellen zur Proliferation stimulieren und dadurch das Tumorwachstum begünstigen sollen (Coppe *et al.*, 2010; Davalos *et al.*, 2010).

5.2.2 Die Seneszenz im T-Zell-Lymphom wird durch das Zytokin TGFβ vermittelt

Als Stimulus der transkriptionellen Regulation von *p15Ink4b* sind zwei Zytokine beschrieben:

Das pleiotrophe Zytokin Il6 kann durch eine von C/EBPβ-vermittelte Transaktivierung die Transkription von *p15Ink4b* regulieren (Kuilman *et al.*, 2008). In dem von uns verwendeten Mausmodell konnte keine Evidenz für eine Il6-abhängige Stimulation nachgewiesen werden, da sich die Transkription von *Il6* zwischen den Thymi und den Tumoren nicht unterschied (Abb.4.27A).

Als zweiter Stimulus für die Transkription von *p15Ink4b* ist TGFβ bekannt. Die TGFβ-Familie besteht aus drei Mitgliedern TGFβ1, TGFβ2 und TGFβ3. Während die Transkription von *Tgfβ1*

nicht erhöht wurde, ergab die Analyse der Isoformen *Tgfβ2* und *Tgfβ3* einen signifikanten Anstieg der mRNA-Mengen innerhalb der Tumore im Vergleich zu nicht-transgenen Thymi und prälymphogenen Thymi (Abb.4.27B). Durch Verwendung eines Antikörpers, der hauptsächlich TGFβ2 und zu geringen Teilen die Isoform TGFβ3 erkennt, konnte dieses Ergebnis auch auf Proteinebene validiert werden (Abb.4.27C). Um die Aktivität des TGFβ-Signalweges nachzuweisen, wurde eine immunhistochemische Färbung auf die phosphorylierte Form von Smad2/3 durchgeführt. Hierbei konnte ein deutlicher Anstieg der positiven Färbung in den Tumoren beobachtet werden (Abb.4.28A). Smad2 und 3 sind intrazelluläre Proteine, die TGFβ-induzierte Signale vermitteln. Die Aktivierung der TGFβ-Rezeptoren führt zur Phosphorylierung von Smad2/3-Proteinen, die daraufhin in den Zellkern wandern, wo sie im Komplex mit Smad4 die Transkription von Zielgenen regulieren (Massague, 2008). Trotz der gesteigerten Transkription von *Tgfβ1* in den Thymi, war dessen Expression offensichtlich nicht ausreichend, um die Aktivierung des TGFβ-Signalweges auszulösen. Die TGFβ2/3–abhängige Aktivierung des Signalweges konnte durch eine Analyse von TGFβ-Zielgenen bestätigt werden (Abb.4.28B). Die Transkription der beiden durch den Signalweg aktivierten Gene *Pai1* und *Mixl1* war in den Lymphomen erhöht, das durch TGFβ reprimierte Zielgen *SnoN* lag in seiner Expression in den Lymphomen erniedrigt vor. Für Pai1 konnten die in der quantitativen PCR erlangten Ergebnisse auch auf Proteinebene bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Um eine unterschiedliche Antwort auf die Stimulation mit TGFβ von Myc-wt- und MycV394D-exprimierenden Zellen nachzuweisen, wurden Lymphomzellen *ex vivo* mit dem Zytokin behandelt. Im Gegensatz zu MycV394D-exprimierenden Zellen konnte in Myc-wt-exprimierenden Zellen weder eine Induktion von p15Ink4b noch Seneszenz nach TGFβ-Zugabe beobachtet werden (Abb.4.29A und C). Auch der TGFβ-vermittelte Zellzyklusarrest wurde ausschließlich in MycV394D-exprimierenden Zellen beobachtet, obwohl der TGFβ-Signalweg in beiden Zelltypen gleichermaßen aktiv war (Abb.4.29B und 4.29A). Diese Beobachtungen stimmen mit Daten aus B-Lymphozyten überein, in denen nachgewiesen wurde, dass transgenes Myc die transkriptionelle Induktion von *p21Cip1* und *p15Ink4b* nach Zugabe von TGFβ blockiert (Reimann *et al.*, 2010). Die Autoren dieser Studie bestätigen unsere Hypothese, dass die konstitutive Expression von Myc die Promotoren von *Cdkn1a* und *Cdkn2b* durch Interaktion mit Miz1 permanent reprimiert. Durch die Infektion der Lymphomzellen mit der Ektodomäne des humanen TGFβ Rezeptors, dessen Expression die TGFβ-Stimulation antagonisiert (Thomas und Massague, 2005), konnte die Proliferation der MycV394D-exprimierenden Zellen selektiv erhöht werden (Abb.4.30). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass MycV394D die

Sensitivität von Zellen gegenüber TGFβ erhöhte und im Gegensatz zu Myc-wt zu einem permanenten Proliferationsarrest führte. Demnach ist die Interaktion von Myc und Miz1 nötig, um die Tumor-suppressive Wirkung von TGFβ zu umgehen und die Tumorgenese zu beschleunigen.

TGFβ konnte bereits in Zellkultur als Auslöser von Seneszenz in Myc transformierten Zellen nachgewiesen werden (Wu *et al.*, 2009). Dafür ist die Expression des Myc-Antagonisten Mad1 essenziell, was in diesem Modell dafür spricht, dass Myc-vermittelte Aktivierung von Zielgenen primär an der Inhibition der Seneszenz beteiligt ist. Die Seneszenz in Lymphomzellen ist ein von TGFβ-abhängiger Prozess, denn sobald die Aktivität des TGFβ-Signalweges durch die Expression von TβR-II-ED vermindert wurde, waren reimplantierte Tumorzellen nicht in der Lage permanent zu arretieren. Dies konnte sowohl in der SA-β-Gal Färbung als auch in der Immunfärbung auf trimethyliertes H3K9 beobachtet werden (Abb.4.31B und Jan van Riggelen, persönliche Mitteilung). Ein funktioneller TGFβ-Signalweg wirkte *in vivo* Tumor-suppressiv, da dessen Inhibition das Wiederauftreten von bereits zurückgebildeten Tumoren verstärkte und damit die Überlebenszeit der Mäuse verkürzt wurde. Dabei hatte die Inhibition von TGFβ keinen Einfluss auf das erstmalige Auftreten von Tumoren nach der Injektion von Lymphozyten in immunokompetente Mäuse (Jan van Riggelen, persönliche Mitteilung). Auch im B-Zell-Lymphom konnte nachgewiesen werden, dass TGFβ die Myc-induzierte Lymphogenese durch Verstärkung der Seneszenz vermindert (Reimann *et al.*, 2010). In dieser Studie wurde gezeigt, dass nicht die Lymphozyten selbst, sondern die umgebenden Makrophagen, ausgehend von einem apoptotischen Signal der Lymphozyten, TGFβ1 sekretieren und dadurch die Lymphozyten zur Seneszenz stimulieren werden. In unserem Mausmodell können wir davon ausgehen, dass die T-Lymphozyten selbst als Quelle für TGFβ dienten, da zum einen das Abschalten von Myc in etablierten Lymphomzellen eine Induktion von TGFβ bewirkte (Abb.4.32B) und zum anderen erhöhte Mengen von TGFβ–Transkripten *in vivo* in Tumorenzellen selbst gefunden wurden (Abb.4.27).

5.2.3 Erhöhte Mengen an *p15Ink4b*-Transkripten resultieren aus einem Defekt der MycV394D Mutante, den Genlokus zu reprimieren

P15Ink4b und *p57Kip2* sind direkte Zielgene des Myc/Miz1-Komplexes (Adhikary et al, 2003; Staller *et al.*, 2001). Die unterschiedlich starke Transrepression der beiden Zielgene abhängig von Myc-wt und MycV394D ist dadurch zu erklären, dass MycV394D durch die fehlende Interaktion mit Miz1 das Potential zur Repression von Zielgenen verloren hat und dies dadurch bedingt zu einer gesteigerten Transkription führt.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden Lymphomzellen in Zellkultur etabliert und die Expression des transgenen Myc durch Zugabe von Doxyzyklin abgeschaltet. Das Zeitverlaufsexperiment zeigte, dass durch die Herunterregulation des transgenen Myc-Proteins die Repression beider Genloki aufgehoben wurde (Abb.4.25B). Dies wurde in einem *in vivo* Experiment mit re-implantierten T-Lymphozyten reproduziert (Jan van Riggelen, persönliche Mitteilung).

Um auszuschließen, dass es sich bei den beschriebenen Ergebnissen um einen klonalen Effekt der gewählten Zelllinien handelte, wurde eine etablierte, für Myc-wt transgene T-Zelllinie mit retroviralen Konstrukten für Myc-wt und MycV394D infiziert und die transgene Expression abgeschaltet. Sowohl *p15Ink4b* als auch *p57Kip2* waren in MycV394D-exprimierenden Zellen stärker exprimiert als in Myc-wt-exprimierenden Zellen, wohingegen sich kein Unterschied in der Menge von p21Cip1 feststellen ließ (Abb.4.26). Ebenfalls konnte in dem konstruierten Zellkultursystem eine durch MycV394D vermittelte Reduktion der Proliferationsrate festgestellt werden (Abb.4.26C). Damit korrelierten diese Daten mit den Resultaten, die der Vergleich von Tumorproben erbrachte und zeigen einen spezifischen Unterschied in der Transrepression auf, der aus der Interaktion von Myc und Miz1 resultiert.

5.2.4 Sowohl Myc-wt als auch die Interaktions-defiziente Mutante MycV394D besetzen die Promotoren ihrer Zielgene

Das Valin an Position 394 der Proteinsequenz ist hochkonserviert innerhalb von c-Myc und N-Myc und befindet sich innerhalb des Helix-Loop-Helix-Motivs. Die Mutation dieser Aminosäure unterdrückt die Interaktion von Myc zu Miz1 und verhindert die Repression Miz1-aktivierter Gene (Herold *et al.*, 2002). In ChIP-Experimenten wurde untersucht, ob die fehlende Interaktion zu Miz1 auch die Interaktion zu den Promotoren reprimierter Gene beeinflusst. Die Präzipitation von Myc in Myc-wt und MycV394D-exprimierenden Tumoren ergab eine deutliche Akkumulation beider Proteine auf den Promotoren aktivierter Gene (*H2a.z*), sowie überraschenderweise auch auf denen der reprimierter Gene (*Cdkn2a*, *Cdkn1a*) (Abb.4.24A und B). Bisher gültige Modelle zur Transrepression von Myc gehen davon aus, dass das Myc/Max-Heterodimer erst durch die direkte Bindung von Miz1 an die Zielpromotoren, die keine E-Box enthalten, rekrutiert werden kann. Die Interaktion von Myc zu Miz1 bewirkt, dass die Bindung von Miz1 zu p300 aufgelöst wird (Adhikary und Eilers, 2005). Dieses Modell wird durch Beobachtungen aus meiner Arbeit in Frage gestellt, da das MycV394D-Protein ebenso wie Myc-wt unabhängig von Miz1 in vergleichbarer Menge an Zielpromotoren reprimierter Gene detektiert

werden konnte. Meine Beobachtungen werden von weiteren Untersuchungen unterstützt: Zum einen resultiert eine Mutation der nicht-kanonischen E-Box (CAGCTG) zur kanonischen E-Box (CACGTG) in einer verstärkten Myc-vermittelten Repression des Reporterkonstrukts (J.F. Naud, persönliche Mitteilung). Weiterhin konnten in einer genomweiten ChIP-Sequenzierung 8400 Bindestellen für Miz1 identifiziert werden. Davon werden 7800 gemeinsam von Myc und Miz1 besetzt, wobei nicht alle diese Gene durch Myc reprimiert werden (Susanne Walz, persönliche Mitteilung). Diese Beobachtungen zeigen einerseits, dass durch die Interaktion von Myc und Miz1 nicht zwangsläufig auf eine Repression zu schließen ist und andererseits dass die Bindung von Myc am Kernpromoter nicht unmittelbar mit einer Aktivierung assoziiert ist. Demnach ist die Bindung an Miz1 notwendig für Myc um Genrepression zu vermitteln, die Bindung an den Promoter erfolgt aber wahrscheinlich unabhängig von Miz1.

5.2.5 Die Expression des Tumorsuppressors p15Ink4b ist nicht ausschlaggebend, um die Tumorgenese zu verzögern

P15Ink4b zeigte als einziger der Gruppe der Zellzyklusinhibitoren eine signifikante und robuste Deregulation der mRNA-Menge im Vergleich von durch Myc-wt und MycV394D gesteuerten Tumoren (Tobias Otto, persönliche Mitteilung). Daher stellte sich die Frage, ob die von der mangelnden Myc/Miz1-Interaktion abhängige Verzögerung der Tumorgenese durch eine Deletion des *Cdkn2b*-Lokus revertiert werden kann. Mäuse mit einer homozygoten Deletion für *Cdkn2b* wurden mit EμSR-tTA Mäusen und Myc-wt, bzw. MycV394D transgenen Mäusen gekreuzt. Die Verpaarung dieser heterozygoten Stämme (EμSR-tTA$^{+/-}$,*Cdkn2b*$^{+/-}$ und Myc(wt/V394D)$^{+/-}$, *Cdkn2b*$^{+/-}$) ergab doppelt-transgene p15Ink4b konstitutive *knockout*-Mäuse (EμSR-tTA$^{+/-}$, Myc(wt/V394D)$^{+/-}$,*Cdkn2b*$^{-/-}$), deren Tumor-freies Überleben beobachtet wurde. Überraschenderweise zeigte die Deletion des *Cdnk2b*-Lokus weder einen Einfluss auf die Tumorgenese der Myc-wt-exprimierenden Mäuse, noch beschleunigte sie die Tumorprogression in MycV394D-exprimierenden Tumoren (Daten nicht gezeigt).

Der konstitutive *knockout* von *Cdkn2b* wurde von Latres und Kollegen beschrieben (Latres *et al.*, 2000). In MEFs führt der Verlust von p15Ink4b zu einer erhöhten Proliferation und kooperiert mit onkogenem Ras in der Transformation. Der durch TGFβ-eingeleitete Wachstumsarrest wird durch die Depletion von *p15Ink4b* nicht eingeschränkt (Latres *et al.*, 2000). Daher sind unter diesen Umständen andere Zielproteine für den Proliferationsdefekt als Antwort auf TGFβ-Stimulation verantwortlich. Es konnte gezeigt worden, dass TGFβ die Expression der Tyrosin-Phosphatase Cdc25A inhibiert. Diese reguliert die Aktivität von Cdks (Iavarone und Massague, 1997). In

HepG2 Zellen wird Zellzyklusarrest nach TGFβ-Stimulation durch direkte Inhibition von Cdk2 vermittelt (Nagahara *et al.*, 1999). Die Expression der Zellzyklusinhibitoren p16Ink4a, p21Cip1 und p27Kip1 verändert sich in *Cdkn2b*$^{-/-}$ Zellen nach TGFβ-Stimulation nicht, wobei die Bindung von p16Ink4a an Cdk4 in Abwesenheit von p15Ink4b deutlich erhöht ist (Latres *et al.*, 2000). Obwohl p15Ink4b durch den Einfach-*Knockout* des *Cdkn2b*-Lokus nur als schwacher Tumorsuppressor identifiziert wurde (Latres *et al.*, 2000), spielt p15Ink4b offensichtlich eine wichtigere Rolle in Abwesenheit von p16Ink4a (Krimpenfort *et al.*, 2007). Mäuse, bei denen eine Deletion des gesamten *Cdkn2ab*-Lokus vorliegt sind anfälliger für Tumorbildung als *Cdkn2a*$^{-/-}$-Mäuse. In p16Ink4a deletierten MEFs sind p15Ink4b-Mengen signifikant erhöht und dessen Bindung zu Cdk4 verstärkt (Krimpenfort *et al.*, 2007). Diese Daten lassen darauf schließen, dass p15Ink4b die Funktionen von p16Ink4a partiell substituieren kann und deshalb die Deletion beider Gene einen synergistischen Effekt ausüben. Dadurch bietet sich ein Erklärungsansatz, warum in humanen Tumoren oft der gesamte *CDKN2AB*-Lokus, der für p16Ink4a und p15Ink4b kodiert, deletiert ist. Ob dieser synergistische Effekt, den p15Ink4a im *Cdkn2a*$^{-/-}$ Mausmodell ausübt, im Tumormodell der MycV394D x *Cdkn2b*$^{-/-}$ transgenen Mäuse auch umgekehrt anwendbar ist, bleibt zu ermitteln. Dass dies allerdings von der Interaktion von Myc zu Miz1 abhängen könnte ist zweifelhaft, da *Cdkn2a* nicht als Zielgen des Myc/Miz1-Komplexes bekannt ist. Allerdings liegt die Vermutung nahe, dass TGFβ selbst durch den Myc/Miz-Komplex reguliert wird (vgl. Abschnitt 5.2.7) und demnach das für die Lymphogenese kritische reprimierte Zielgen darstellen könnte.

Da p15Ink4b offensichtlich nicht das kritische Zielprotein von TGFβ im Myc-gesteuerten T-Zell-Lymphom ist wurde eine genomweite Expressionsanalyse durchgeführt. Die Auswertung der Analyse identifizierte eine große Gruppe an Genen, deren Expression nach dem Abschalten von Myc TGFβ-abhängig hochreguliert wurde. GO-term Analysen zeigten eine signifikante Anreicherung von Genen die an der Gewebe-spezifischen Differenzierung beteiligt sind (Jan van Riggelen und Birgit Samans, persönliche Mitteilung). Dies deutet daraufhin, dass das Auftreten der Seneszenz assoziiert ist mit Differenzierung von Zellen und deren Verlust der Pluripotenz.

Durch GSEA-Analysen wurde eine signifikante Übereinstimmung zwischen dieser Gengruppe und Genen, die durch Polycomb-Repressions-Komplexe reguliert werden, identifiziert (Boyer *et al.*, 2006). Die Hauptaufgabe der Polycomb-Komplexe ist die permanente Repression der *Hox*-Gene, die in der Emryonalentwicklung die Musterbildung und Segmentdetermination bestimmen (Pearson *et al.*, 2005). Polycomb-Komplexe verändern die Chromatinstruktur ihrer Zielgene durch Trimethylierung von Lysin27 am Histon 3 (H3K27triMe) und in geringerem Maß an

Lysin9 des Histons und verursachen damit eine andauernde Heterochromatisierung. Auf Grund der Analyse lässt sich vermuten, dass Myc in Kooperation mit TGFβ die Expression der Polycomb-Zielgene entweder direkt an den entsprechenden Promotoren oder indirekt durch Assoziation mit Polycomb-Komplexen beeinflusst. Die Kombination der innerhalb meiner Arbeit gewonnenen Daten ergibt ein Modell, in der die Interaktion von Myc und Miz1 benötigt wird um Polycomb-Zielgene zu reprimieren und dadurch die Ausbildung der TGFβ-abhängigen Seneszenz zu vermeiden. Aus dieser Hypothese ergibt sich eine Vielzahl neuer Versuchsansätze. Zum einen könnte in Zellkultur die Abhängigkeit der Seneszenz in MycV394D-exprimierenden Zellen von der Expression von Bmi1, einem essenziellen Faktor innerhalb der Polycomb-Komplexe, getestet werden. Weiterhin könnte die Beeinflussung der Expression der Polycomb-Zielgene nach Stimulation mit TGFβ in Myc-wt- und MycV394D-exprimierenden Zellen überprüft werden. Letztlich bietet es sich an, durch *new generation sequencing*-Methoden, wie ChIP-Sequenzierung, die Genloki die durch Trimethylierung der Histone markiert sind zu sequenzieren und mit Myc-Zielgenen zu vergleichen.

5.2.6 Cdks und Myc kooperieren bei der Ausbildung von Seneszenz

Bisher konnte nur in Lymphomen gezeigt worden, dass Myc unabhängig von weiteren Mutationen oder Manipulationen Seneszenz auslösen kann (Reimann *et al.*, 2010). In Melanomzellen wirkt Myc der Seneszenz sogar entgegen und erst die Herunterregulation des Proteins erlaubt die Ausprägung der Ras-vermittelten Seneszenz (Zhuang *et al.*, 2008). Es ist anzunehmen, dass die zelluläre Antwort, die aus der Überexpression von Myc resultiert, vergleichbar der Apoptose vom Schwellenwert des Proteins abhängt (Murphy *et al.*, 2008). Zwei Studien bestätigen unsere Beobachtungen, dass Myc nur in Kombination mit einer weiteren genetischen Veränderung zur Verstärkung von Seneszenz führt (Campaner *et al.*, 2010; Grandori *et al.*, 2003).

Zum einen induziert Myc Seneszenz in Zellen, die deletiert für das Werner-Syndrom-Protein (WRN) sind (Grandori *et al.*, 2003).

Zum anderen bewirkt die Deletion oder pharmazeutische Inhibition von Cdk2 die Ausprägung der Seneszenz in Myc-exprimierenden Zellen sowohl in Zellkultur als auch im Mausmodell. Dieser Prozess ist sowohl vom p53- als auch vom pRb-Signalweg abhängig, wobei in diesem System die Relevanz von p16Ink4a überwiegt. Eingeleitet wird die Seneszenz durch ein von Cdk2-

unabhängiges Auftreten von DNA-Schaden und ROS. Die Expression von Cdk2 beschleunigt die Tumorgenese (in dieser Studie die Lymphogenese in B-Zellen) durch die Unterdrückung der Seneszenz. Dieses Phänomen ist offenbar abhängig von der Art des Tumors. In der Mundschleimhaut zu Beispiel beeinflusst Cdk2 die Myc-induzierte Tumorgenese nicht (Macias *et al.*, 2007).

Campaner und Kollegen postulieren einen Mechanismus, bei dem Cdk2 ein für die Autoren unbekanntes Substrat phosphoryliert, um zelluläre Seneszenz zu inhibieren (Campaner *et al.*, 2010). Cdk2 interagiert spezifisch mit den Zyklinen E und A und vermittelt dadurch den Eintritt in die S-Phase und wird direkt durch Myc reguliert. Zeitgleich mit der Studie von Campaner und Kollegen identifizierten Hydbring und Kollegen Myc als Substrat von Cdk2. Dieses phosphoryliert Myc am Ser62 und bewirkt dadurch die Unterdrückung Ras-induzierten Seneszenz (Hydbring *et al.*, 2010). Übereinstimmend mit unserem Mausmodell vermittelt p27Kip1 die Inhibition von Cdk2 und begünstigt dadurch das Auftreten der Seneszenz. Durch die Hochregulation von D-Typ Zyklinen inaktiviert Myc p27Kip1 indirekt (Bouchard *et al.*, 1999; Perez-Roger *et al.*, 1999) und beeinflusst damit die Ausprägung von Seneszenz. Es besteht eine Verbindung der p27Kip1 Expression und dem TGFβ-Signalweg, da TGFβ die Degradation von p27Kip1 inhibieren kann (Lecanda *et al.*, 2009) und dadurch direkt hohe Mengen an p27Kip, wie sie in MycV394D-exprimierenden Tumoren beobachtet wurden, begünstigt (Tobias Otto, persönliche Mitteilung). In der Studie von Hydbring und Kollegen konnte die Funktion von Cdk2 nicht durch Cdk1 kompensiert werden. Am Beispiel von N-Myc wurde allerdings gezeigt, dass auch Cdk1 die Phosphorylierung am Ser62 des Proteins beeinflussen kann (Sjostrom *et al.*, 2005). In unserem Mausmodell korrelierte eine verstärkte Expression von Cdk1 in Myc-wt-exprimierenden Tumoren mit verminderter Seneszenz. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich unterschiedliche Cdks vergleichbar ihrer Funktion in der murinen Embryonalentwicklung zumindest in bestimmten Zellen, bzw. Geweben redundant zueinander verhalten (Berthet *et al.*, 2003; Geng *et al.*, 2003; Ortega *et al.*, 2003). Eine Korrelation von Cdk1 und c-Myc konnte schon früher gezeigt werden. Die Inhibition von Cdk1 durch *small-molecule inhibitors* resultiert in reduzierten Wachstum von Myc-gesteuerten Lymphomen und veranlasst die Zellen zur Apoptose (Goga *et al.*, 2007).

Es wurde ein inhibierender Einfluss von TGFβ auf die Aktivität des Zyklin E/Cdk2-Komplexes beschrieben, indem TGFβ die Cdk- aktivierende Kinase (CAK) hemmt (Nagahara *et al.*, 1999). In Kombination mit den Daten von Campaner *et al.* und Hydbing *et al.* ist ein von p15Ink4b unabhängiger Mechanismus beschrieben, infolge dessen TGFβ die Ausprägung der Seneszenz

fördern könnte und dadurch die Myc-induzierte Tumorgenese blockiert. Durch TGFβ inhibiert, wird die von Cdk2 vermittelte Phosphorylierung an Myc nicht ausgeführt. Der Prozess der Seneszenz wird unterdrückt und im Gegenzug die Tumorgenese induziert. Ob dies auch für Cdk1 gilt könnte in weiterführenden Experimenten aufgeklärt werden.

5.2.7 Myc und TGFβ üben einen antagonistischen Effekt aufeinander aus

Die Stimulierung mit TGFβ aktiviert eine Signalkaskade, die den Zellzyklus in vielen unterschiedlichen Zelllinien arretiert. Ein gut untersuchtes Zielgen von TGFβ ist *p15Ink4b*, dessen Genprodukt in proliferierenden Zellen reprimiert und in arretierten Zellen hoch exprimiert ist. Die Aktivitäten von Myc und TGFβ haben auf den *Cdkn2b* Promoter eine gegensätzliche Wirkung. Die Regulierung von p15Ink4b durch TGFβ wird durch einen dualen Mechanismus erlangt. Zum einen reguliert TGFβ die Expression von Myc auf transkriptioneller Ebene herunter. Dadurch wird Miz1 aus dem Myc/Miz1-Komplex befreit und die Repression am Promoter von *Cdkn2b* geht verloren (Staller *et al.*, 2001). Zum anderen beeinflusst TGFβ aktiv die Rekrutierung der die Smad2/3-Smad4-Komplexe, die den Promoter zusammen mit Miz1 oder Sp1 aktivieren können (Seoane *et al.*, 2001).

Die Stimulation mit TGFβ vermittelt im Laufe der Tumorgenese gegensätzliche Prozesse. Im frühen Stadium der Krebsentwicklung inhibiert TGFβ den Zellzyklus wohingegen das Protein im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf das Tumorwachstum beschleunigt. Um die Proliferation transformierter Zellen zu unterdrücken, reprimiert TGFβ die Expression von c-Myc in einem von der Aktivierung der Smad-Proteine-abhängigem Prozess (Massague *et al.*, 2000). Durch Smad-unabhängige Signalkaskaden kann TGFβ die Migration und Invasion von Krebszellen begünstigen (Derynck und Zhang, 2003). Der Auslöser, durch den die Tumor-suppressive Wirkung von TGFβ in eine Proliferations-stimulierende umgewandelt wird, ist bisher nicht bekannt. Nachdem beschrieben wurde, dass TGFβ Myc in Tumorzellen transkriptionell auch induzieren kann (Singh *et al.*, 2010), ist ein Einfluss von Myc auf diesen Prozess wahrscheinlich. Im Laufe der Tumorgenese kann die zelluläre Antwort auf TGFβ moduliert werden und Tumorzellen eine Resistenz gegenüber dem von TGFβ-ausgelösten Signal vermittelt werden (Woodford-Richens *et al.*, 2001). Dies konnte auch in einer Lymphom-Zelllinie beobachtet werden, in der nach TGFβ-Zugabe keine Phosphorylierung von Smad mehr möglich war (Abb.4.29A). Im verwendeten Modell des T-Zell-Lymphoms ist allerdings davon auszugehen, dass die Tumor-suppressive Wirkung von TGFβ erhalten blieb, nachdem die Menge an TGFβ mit der Seneszenz der Zellen *in vivo* korrelierte (vgl. Abb.4.19 und Abb.4.27B). Darüber hinaus

bewirkte die Stimulation mit TGFβ in etablierten Lymphom-Zelllinien keine Induktion von Myc, sondern eine Herunterregulation des Proteins (Daten nicht gezeigt), aus der ein G1-Phase Arrest mit anschließender Seneszenz resultierte (Abb.4.29).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte neben dem Einfluss, den TGFβ auf die Expression von Myc hat ebenfalls gezeigt werden, dass Myc die Transkription der beiden Isoformen TGFβ2 und 3 beeinflusst. Zellkulturexperimente konnten zeigen, dass das Abschalten von Myc eine Induktion der mRNA-Menge von TGFβ bewirkte (Abb.4.32B) und der TGFβ-Signalweg aktiviert wurde (Abb.4.32A). Daraus lässt sich schließen, dass hohe Mengen von Myc eine reprimierende Wirkung auf die Transkription von TGFβ ausüben. Um zu untersuchen. ob es sich dabei um einen direkten Effekt handelt, wurden ChIP-Experimente durchgeführt. Dadurch konnte die Anwesenheit von Myc direkt auf den *Tgfβ*-Promotoren nachgewiesen werden (Abb.4.33). Dies bestätigt die auf ChIP-*Screen* basierende Identifikation von *Tgfβ2* und *3* als Myc-Zielgen (Fernandez *et al.*, 2003). Ob es sich dabei um eine von Miz1-abhängige Promoterbindung handelt, konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, da ChIP-Experimente zum Nachweis von Miz1 auf den TGFβ-Promotoren auf Grund mangelhafter Antikörper fehlschlugen. Es gibt allerdings drei Beobachtungen, die für eine Kooperation von Myc und Miz1 auf den *Tgfβ*-Promotoren und damit zusammenhängender Repression sprechen. Zum einen wurde TGFβ in MycV394D-exprimierenden Tumoren höher exprimiert als in Myc-wt Tumoren (Abb.4.27B). Die Transkription von *Tgfβ* korrelierte demnach mit der mRNA-Menge des etablierten reprimierten Zielgens dieses Komplexes *p15Ink4b*. Zweitens zeigten T-Lymphozyten, die mit Myc-wt und MycV394D Expressionsplasmiden infiziert wurden, eine Repression von TGFβ3 durch Myc-wt aber nicht durch MycV394D (Daten nicht gezeigt). Drittens konnten in humanen Zellen durch ChIP-Sequenzierung Bindestellen für Myc und Miz1 am TGFβ2 Promotor identifiziert werden (Susanne Walz, persönliche Mittelung). Während der Lymphombildung ist demnach Myc direkt daran beteiligt, die Tumor-suppressive Wirkung von TGFβ zu reprimieren um die Tumorgenese zu beschleunigen.

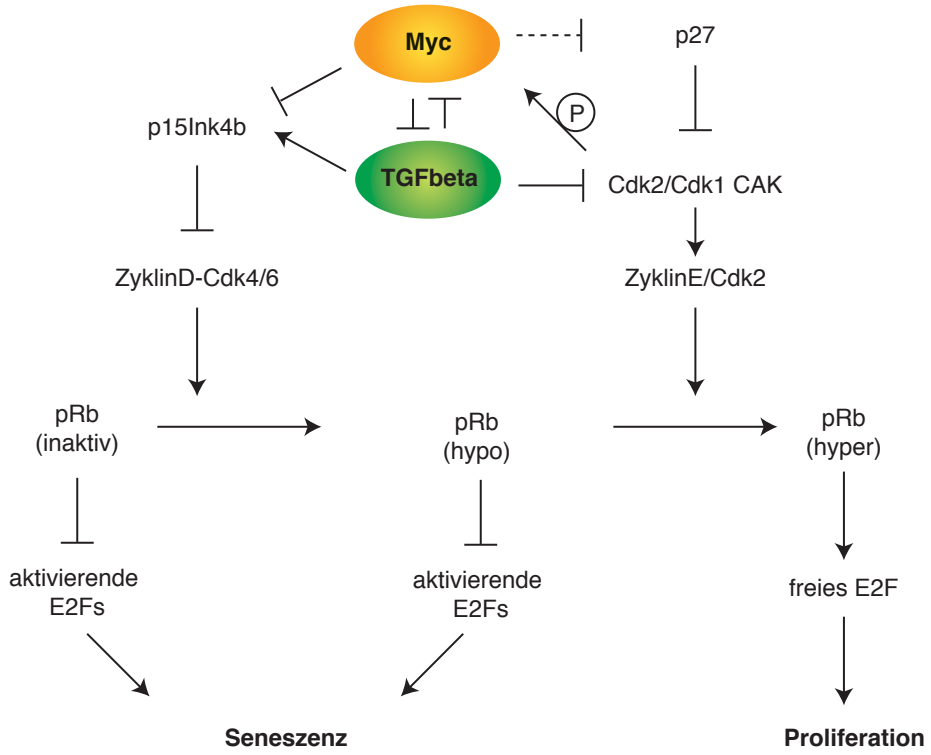


Abb. 5.2: Übersicht über die von Myc und TGFβ-vermittelten Signalwege zur Stimulation der Proliferation oder Ausprägung der Seneszenz.
Myc und TGFβ üben jeweils antagonistische Effekte aufeinander aus. TGFβ stimuliert die Seneszenz einerseits durch Aktivierung der Transkription von *p15Ink4b* andererseits durch die Inhibition des Zellzyklus durch Hemmung von Cdk2. Myc stimuliert die Proliferation durch Repression des *Cdkn2b*-Lokus und durch indirekte Inaktivierung von p27Kip1. Durch Cdk-abhängige Phosphorylierung von Myc am Ser62 wird Seneszenz verhindert. Abgebildete Funktionen von Myc sind abhängig von dessen Interaktion zu Miz1. Die Abbildung wurde modifiziert nach Nagahara et al., 1999)

5.3 Der Vergleich von Apoptose und Seneszenz als Tumor-suppressive Mechanismen

Seneszenz und Apoptose sind zwei Mechanismen, die den Organismus davor bewahren, beschädigte Zellen anzuhäufen, Mutationen an Tochterzellen zu vererben und schließlich der Tumorentstehung vorbeugen. Die Kombination der beiden Mechanismen ist überaus effektiv, denn trotz einer Vielzahl konstant proliferierender Zellen und ständiger Exposition gegenüber Mutations-auslösender Substanzen, entwickelt jeder Organismus innerhalb seiner Lebenszeit durchschnittlich weniger als einmal einen Tumor (Lowe *et al.*, 2004). Beeindruckend ist, dass die Unterscheidung, ob es sich innerhalb eines Gewebes um normal-proliferierende oder entartete Zellen handelt über die Anwendung der zelleigenen Abwehrmechanismen entscheidet um die Verbreitung Letzterer zu verhindern.

Dennoch stellt sich die Frage, warum der Mechanismus der Seneszenz sich evolutionär gesehen etablieren konnte, nachdem die Apoptose eine effektivere Alternative darstellt, die entsprechende Zellen nicht nur arretiert, sondern sie sofort vollkommen eliminiert. Möglich wäre, dass sich der Austausch von Zellen für den Organismus nachteilig auswirkt, wenn sie, wie langlebige Melanozyten beispielsweise in großer Zahl im humanen Organismus auftreten. Außerdem ist die Seneszenz ein Mechanismus der zum Alterungsprozess von Organismen beiträgt (Campisi, 2003). Weiterhin ist denkbar, dass gealterte Zellen sich während ihrer Lebenszeit Fähigkeiten angeeignet haben, die für den Organismus essentiell sind und dadurch nicht eliminiert werden sollten. Diese Hypothese ist gerade für die innerhalb dieser Arbeit untersuchten Zellen des Immunsystems denkbar.

Die Entscheidung, ob eine Zelle Apoptose oder Seneszenz durchläuft hängt möglicherweise von ihrem genetischen Hintergrund ab. Komponenten aus der RAS-RAF-MEK-Signalkaskade neigen eher dazu Seneszenz zu induzieren, wohingegen Onkogene wie Myc, die Zellen in die Apoptose führen (Lowe *et al*., 2004). Allerdings ist auch bekannt, dass das gleiche onkogene Signal in unterschiedlichen Zellen sowohl Apoptose als auch Seneszenz auslösen kann (Dimri *et al*., 2000). Daher könnte man vermuten, dass ein Tumor-suppressiver Mechanismus als Ersatz für den Anderen dient (Lowe *et al*., 2004). Dem gegenüber stehen allerdings Beobachtungen, dass zumindest in Zellkultur die Inhibition der Apoptose keine Verstärkung der Seneszenz zur Folge hat (Campaner *et al*., 2010). Für beide Mechanismen, die Apoptose und Seneszenz, gilt, dass ein Vergleich der extra- und intrazellulären Signale nötig ist um die Entscheidung zwischen Leben und Tod oder Wachstum und Arrest treffen zu können.

6 Zusammenfassung

Während der Entstehung von Tumoren können zwei Mechanismen auftreten, die beide von der Aktivität der Onkogene abhängig sind und die Tumorgenese einschränken. Für das Onkogen Myc ist gezeigt, dass es sowohl Apoptose als auch unter bestimmten Umständen Seneszenz auslösen kann und damit sein eigenes onkogenes Potential limitiert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich mich mit diesen Tumor-suppressiven Mechanismen in zwei unabhängigen Teilprojekten beschäftigen.

Eine erhöhte Expression von Myc steigert die Proliferation der Zellen, induziert aber gleichzeitig Doppelstrangbrüche an der DNA. Durch den dadurch entstandenen Schaden wird die DNA-Schadensantwort ausgelöst, die zum Beispiel zur Phosphorylierung von H2A.X durch die Kinasen Atm und Atr führt. Ein weiteres putatives Zielprotein dieser Kinasen ist HectH9, das abhängig vom DNA-Schaden das mitochondriale Protein Mcl1 ubiquitiniert und es damit für den proteasomalen Abbau markiert. Im ungestressten Zustand interagiert das in der mitochondrialen Membran lokalisierte Protein Mcl1 mit proapoptotischen Proteinen und hält deren inerten Status aufrecht. Die Reduktion der Mcl1-Mengen ist essentiell, um die proapoptotischen Proteine zu aktivieren, dadurch die Freisetzung von Zytochrom C aus dem Mitochondrium zu veranlassen und damit den Prozess der Apoptose einleiten zu können. Anhand der in dieser Arbeit dokumentierten Daten bietet sich Mcl1 als potentielles Zielprotein für pharmazeutisch Strategien zur Therapie Myc-induzierter Tumore an. Im Idealfall erhöht eine verstärkte Reduktion seiner Proteinmengen die zelluläre Apoptose und verringert somit das Tumorwachstum.

Im murinen T-Zell-Lymphom wird die Myc-abhängige Tumorgenese durch eine Mutation der Proteinsequenz von Myc verlangsamt. Diese Mutation unterbindet die Bindung von Myc zu Miz1 und verhindert dadurch die Repression von Zielgenen. Abhängig von der Interaktion von Myc zu Miz1 gelingt die Inhibition der Transkription des Zellzyklusinhibitors *p15Ink4b*. Die Interaktion von Myc und Miz1 ist essentiell um die TGFβ-abhängige Seneszenz zu umgehen. Darüber hinaus ist Myc direkt an der Repression von TGFβ beteiligt. Entgegen der bisher verwendeten Modelle konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Myc unabhängig von Miz1 zu den Promotoren der reprimierten Zielgene rekrutiert wird und die Bindung der beiden Proteine offensichtlich nur für die Transrepression essentiell ist.

7 Summary

Apoptosis and senescence are two distinct mechanisms that are induced by oncogenes to limit their oncogenic potential during tumorigenesis. Their appearance seems to be dependent on the specific oncogene. For a long time it is known that the oncogene Myc is a strong inducer of apoptosis. Latest results revealed, that Myc is also able to induce senescence, to prevent transformed cells from proliferating. Within the framework of my PhD I concentrated on both tumor suppressive mechanisms in two independent particular projects.

Increased expression and activity of Myc enhances cell proliferation and thereby induces DNA double strand breaks. This damage activates a DNA damage response which leads to Atm/Atr mediated phosphorylation of H2A.X. A further target of the kinases Atm and Atr is HectH9 which ubiquitinates the mitochondrial protein Mcl1 in a DNA damage dependent manner. The ubiquitination of Mcl1 labels this protein for proteasomal degradation. In unstressed cells Mcl1 is located in the mitochondrial membrane where it interacts with proapoptotic members of the Bcl2 family inhibiting their activity. The reduction of Mcl1 protein is essential for the activation of proapoptotic proteins at the mitochondrium allowing release of cytochrome c as initial step in apoptosis.

Myc mediated tumorigenesis is limited by using a mutant form of Myc as driving oncogene. This mutation inhibits interaction of Myc to its binding partner Miz1. The interaction of Myc and Miz1 is required to repress target genes like *p21Cip1* and *p15Ink4b*. *In vivo* experiments demonstrate that Myc and Miz1 need to bind to each other to bypass TGFβ-dependent senescence. This process is dependent on elevated levels of Myc consequently reduction to physiological levels of the protein induces apoptosis and senescence in a TGFβ dependent manner. In addition, there is evidence that Myc is directly involved in the repression of *Tgfβ*. In contrast to established models of repression by the Myc/Miz1 complex, it was shown, that Myc is recruited to and binds target DNA independently of Miz1. Therefore, I suggest that interaction of both proteins is essential only at the step of transcriptional initiation.

8 Literaturverzeichnis

Abba, M.C., Laguens, R.M., Dulout, F.N., and Golijow, C.D. (2004). The c-myc activation in cervical carcinomas and HPV 16 infections. Mutat Res *557*, 151-158.

Adachi, S., Obaya, A.J., Han, Z., Ramos-Desimone, N., Wyche, J.H., and Sedivy, J.M. (2001). c-Myc is necessary for DNA damage-induced apoptosis in the G(2) phase of the cell cycle. Mol Cell Biol *21*, 4929-4937.

Adhikary, S., and Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. Nat Rev Mol Cell Biol *6*, 635-645.

Adhikary, S., Marinoni, F., Hock, A., Hulleman, E., Popov, N., Beier, R., Bernard, S., Quarto, M., Capra, M., Goettig, S., *et al*. (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, H.P., Moroy, T., and Eilers, M. (2003). Miz1 is required for early embryonic development during gastrulation. Mol Cell Biol *23*, 7648-7657.

Aichberger, K.J., Mayerhofer, M., Krauth, M.T., Skvara, H., Florian, S., Sonneck, K., Akgul, C., Derdak, S., Pickl, W.F., Wacheck, V., *et al*. (2005). Identification of mcl-1 as a BCR/ABL-dependent target in chronic myeloid leukemia (CML): evidence for cooperative antileukemic effects of imatinib and mcl-1 antisense oligonucleotides. Blood *105*, 3303-3311.

Amati, B. (2004). Myc degradation: dancing with ubiquitin ligases. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 8843-8844.

Amati, B., Frank, S.R., Donjerkovic, D., and Taubert, S. (2001). Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription. Biochim Biophys Acta *1471*, M135-145.

Andersson, Y., Juell, S., and Fodstad, O. (2004). Downregulation of the antiapoptotic MCL-1 protein and apoptosis in MA-11 breast cancer cells induced by an anti-epidermal growth factor receptor-Pseudomonas exotoxin a immunotoxin. Int J Cancer *112*, 475-483.

Arabi, A., Wu, S., Ridderstrale, K., Bierhoff, H., Shiue, C., Fatyol, K., Fahlen, S., Hydbring, P., Soderberg, O., Grummt, I., *et al*. (2005). c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. Nat Cell Biol *7*, 303-310.

Artandi, S.E., and DePinho, R.A. (2000). A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. Curr Opin Genet Dev *10*, 39-46.

Arvanitis, C., and Felsher, D.W. (2006). Conditional transgenic models define how MYC initiates and maintains tumorigenesis. Semin Cancer Biol *16*, 313-317.

Askew, D.S., Ashmun, R.A., Simmons, B.C., and Cleveland, J.L. (1991). Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. Oncogene *6*, 1915-1922.

Atherton-Fessler, S., Liu, F., Gabrielli, B., Lee, M.S., Peng, C.Y., and Piwnica-Worms, H. (1994). Cell cycle regulation of the p34cdc2 inhibitory kinases. Mol Biol Cell *5*, 989-1001.

Ayer, D.E., and Eisenman, R.N. (1993). A switch from Myc:Max to Mad:Max heterocomplexes accompanies monocyte/macrophage differentiation. Genes Dev *7*, 2110-2119.

Ayer, D.E., Lawrence, Q.A., and Eisenman, R.N. (1995). Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. Cell *80*, 767-776.

Bae, J., Leo, C.P., Hsu, S.Y., and Hsueh, A.J. (2000). MCL-1S, a splicing variant of the antiapoptotic BCL-2 family member MCL-1, encodes a proapoptotic protein possessing only the BH3 domain. J Biol Chem *275*, 25255-25261.

Bahram, F., von der Lehr, N., Cetinkaya, C., and Larsson, L.G. (2000). c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover. Blood *95*, 2104-2110.

Bardwell, V.J., and Treisman, R. (1994). The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. Genes Dev *8*, 1664-1677.

Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. Cancer Cell *3*, 421-429.

Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., *et al*. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. Nature *434*, 864-870.

Bashir, T., Dorrello, N.V., Amador, V., Guardavaccaro, D., and Pagano, M. (2004). Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. Nature *428*, 190-193.

Beausejour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. EMBO J *22*, 4212-4222.

Bentley, D.L. (2005). Rules of engagement: co-transcriptional recruitment of pre-mRNA processing factors. Curr Opin Cell Biol *17*, 251-256.

Berthet, C., Aleem, E., Coppola, V., Tessarollo, L., and Kaldis, P. (2003). Cdk2 knockout mice are viable. Curr Biol *13*, 1775-1785.

Beverly, L.J., and Varmus, H.E. (2009). MYC-induced myeloid leukemogenesis is accelerated by all six members of the antiapoptotic BCL family. Oncogene *28*, 1274-1279.

Bhatia, K., Huppi, K., Spangler, G., Siwarski, D., Iyer, R., and Magrath, I. (1993). Point mutations in the c-Myc transactivation domain are common in Burkitt's lymphoma and mouse plasmacytomas. Nat Genet *5*, 56-61.

Birrer, M.J., Segal, S., DeGreve, J.S., Kaye, F., Sausville, E.A., and Minna, J.D. (1988). L-myc cooperates with ras to transform primary rat embryo fibroblasts. Mol Cell Biol *8*, 2668-2673.

Blackwell, T.K., Kretzner, L., Blackwood, E.M., Eisenman, R.N., and Weintraub, H. (1990). Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. Science *250*, 1149-1151.

Bouchard, C., Lee, S., Paulus-Hock, V., Loddenkemper, C., Eilers, M., and Schmitt, C.A. (2007). FoxO transcription factors suppress Myc-driven lymphomagenesis via direct activation of Arf. Genes Dev *21*, 2775-2787.

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

Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., and Eilers, M. (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. EMBO J *18*, 5321-5333.

Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K.*, et al*. (2006). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. Nature *441*, 349-353.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem *72*, 248-254.

Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C.A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. Nature *436*, 660-665.

Brodeur, G.M., Seeger, R.C., Schwab, M., Varmus, H.E., and Bishop, J.M. (1984). Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. Science *224*, 1121-1124.

Campaner, S., Doni, M., Hydbring, P., Verrecchia, A., Bianchi, L., Sardella, D., Schleker, T., Perna, D., Tronnersjo, S., Murga, M.*, et al*. (2010). Cdk2 suppresses cellular senescence induced by the c-myc oncogene. Nat Cell Biol *12*, 54-59; sup pp 51-14.

Campbell, C., Quinn, A.G., Ro, Y.S., Angus, B., and Rees, J.L. (1993). p53 mutations are common and early events that precede tumor invasion in squamous cell neoplasia of the skin. J Invest Dermatol *100*, 746-748.

Campisi, J. (2003). Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. Exp Gerontol *38*, 5-11.

Chang, T.C., Yu, D., Lee, Y.S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., Dang, C.V., Thomas-Tikhonenko, A., and Mendell, J.T. (2008). Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. Nat Genet *40*, 43-50.

Chen, D., Kon, N., Li, M., Zhang, W., Qin, J., and Gu, W. (2005). ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. Cell *121*, 1071-1083.

Cheng, S.W., Davies, K.P., Yung, E., Beltran, R.J., Yu, J., and Kalpana, G.V. (1999). c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. Nat Genet *22*, 102-105.

Cho-Vega, J.H., Rassidakis, G.Z., Admirand, J.H., Oyarzo, M., Ramalingam, P., Paraguya, A., McDonnell, T.J., Amin, H.M., and Medeiros, L.J. (2004). MCL-1 expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. Hum Pathol *35*, 1095-1100.

Cleveland, J.L., Huleihel, M., Bressler, P., Siebenlist, U., Akiyama, L., Eisenman, R.N., and Rapp, U.R. (1988). Negative regulation of c-myc transcription involves myc family proteins. Oncogene Res *3*, 357-375.

Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguria, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., *et al*. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. Nature *436*, 642.

Conacci-Sorrell, M., Ngouenet, C., and Eisenman, R.N. (2010). Myc-Nick: A Cytoplasmic Cleavage Product of Myc that Promotes alpha-Tubulin Acetylation and Cell Differentiation. Cell *142*, 480-493.

Coppe, J.P., Desprez, P.Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. Annu Rev Pathol *5*, 99-118.

Cowling, V.H., Chandriani, S., Whitfield, M.L., and Cole, M.D. (2006). A conserved Myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, and G2 arrest. Mol Cell Biol *26*, 4226-4239.

Cowling, V.H., and Cole, M.D. (2006). Mechanism of transcriptional activation by the Myc oncoproteins. Semin Cancer Biol *16*, 242-252.

Cowling, V.H., and Cole, M.D. (2007a). HATs off to capping: a new mechanism for Myc. Cell Cycle *6*, 907-909.

Cowling, V.H., and Cole, M.D. (2007b). The Myc transactivation domain promotes global phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain independently of direct DNA binding. Mol Cell Biol *27*, 2059-2073.

Cowling, V.H., and Cole, M.D. (2008). An N-Myc truncation analogous to c-Myc-S induces cell proliferation independently of transactivation but dependent on Myc homology box II. Oncogene *27*, 1327-1332.

Cuconati, A., Mukherjee, C., Perez, D., and White, E. (2003). DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. Genes Dev *17*, 2922-2932.

d'Adda di Fagagna, F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. Nat Rev Cancer *8*, 512-522.

Dahmus, M.E. (1996). Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. J Biol Chem *271*, 19009-19012.

Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C., and Croce, C.M. (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A *79*, 7824-7827.

Dang, C.V., O'Donnell, K.A., Zeller, K.I., Nguyen, T., Osthus, R.C., and Li, F. (2006). The c-

Myc target gene network. Semin Cancer Biol *16*, 253-264.

Dani, C., Blanchard, J.M., Piechaczyk, M., El Sabouty, S., Marty, L., and Jeanteur, P. (1984). Extreme instability of myc mRNA in normal and transformed human cells. Proc Natl Acad Sci U S A *81*, 7046-7050.

Dansen, T.B., Whitfield, J., Rostker, F., Brown-Swigart, L., and Evan, G.I. (2006). Specific requirement for Bax, not Bak, in Myc-induced apoptosis and tumor suppression in vivo. J Biol Chem *281*, 10890-10895.

Davalos, A.R., Coppe, J.P., Campisi, J., and Desprez, P.Y. (2010). Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. Cancer Metastasis Rev *29*, 273-283.

Davis, A.C., Wims, M., Spotts, G.D., Hann, S.R., and Bradley, A. (1993). A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. Genes Dev *7*, 671-682.

de Alboran, I.M., Baena, E., and Martinez, A.C. (2004). c-Myc-deficient B lymphocytes are resistant to spontaneous and induced cell death. Cell Death Differ *11*, 61-68.

Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z.J. (2000). Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. Cell *103*, 351-361.

DePinho, R., Mitsock, L., Hatton, K., Ferrier, P., Zimmerman, K., Legouy, E., Tesfaye, A., Collum, R., Yancopoulos, G., Nisen, P.*, et al*. (1987). Myc family of cellular oncogenes. J Cell Biochem *33*, 257-266.

Derenne, S., Monia, B., Dean, N.M., Taylor, J.K., Rapp, M.J., Harousseau, J.L., Bataille, R., and Amiot, M. (2002). Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. Blood *100*, 194-199.

Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. Nature *425*, 577-584.

Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A.*, et al*. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. Nature *444*, 638-642.

Dimri, G.P., Itahana, K., Acosta, M., and Campisi, J. (2000). Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. Mol Cell Biol *20*, 273-285.

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

Ding, Q., He, X., Hsu, J.M., Xia, W., Chen, C.T., Li, L.Y., Lee, D.F., Liu, J.C., Zhong, Q., Wang, X.*, et al*. (2007). Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. Mol Cell Biol *27*, 4006-4017.

Dominguez-Sola, D., Ying, C.Y., Grandori, C., Ruggiero, L., Chen, B., Li, M., Galloway, D.A., Gu, W., Gautier, J., and Dalla-Favera, R. (2007). Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. Nature *448*, 445-451.

Draetta, G., and Beach, D. (1988). Activation of cdc2 protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement. Cell *54*, 17-26.

Dvir, A., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (1997). A role for TFIIH in controlling the activity of early RNA polymerase II elongation complexes. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 9006-9010.

Eberhardy, S.R., and Farnham, P.J. (2001). c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. J Biol Chem *276*, 48562-48571.

Eberhardy, S.R., and Farnham, P.J. (2002). Myc recruits P-TEFb to mediate the final step in the transcriptional activation of the cad promoter. J Biol Chem *277*, 40156-40162.

Egle, A., Harris, A.W., Bouillet, P., and Cory, S. (2004). Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 6164-6169.

Eilers, M., Picard, D., Yamamoto, K.R., and Bishop, J.M. (1989). Chimaeras of myc oncoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. Nature *340*, 66-68.

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

Eischen, C.M., Packham, G., Nip, J., Fee, B.E., Hiebert, S.W., Zambetti, G.P., and Cleveland, J.L. (2001a). Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-Myc and E2F-1. Oncogene *20*, 6983-6993.

Eischen, C.M., Roussel, M.F., Korsmeyer, S.J., and Cleveland, J.L. (2001b). Bax loss impairs Myc-induced apoptosis and circumvents the selection of p53 mutations during Myc-mediated lymphomagenesis. Mol Cell Biol *21*, 7653-7662.

Eischen, C.M., Weber, J.D., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Cleveland, J.L. (1999). Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. Genes Dev *13*, 2658-2669.

Eischen, C.M., Woo, D., Roussel, M.F., and Cleveland, J.L. (2001c). Apoptosis triggered by Myc-induced suppression of Bcl-X(L) or Bcl-2 is bypassed during lymphomagenesis. Mol Cell Biol *21*, 5063-5070.

Erisman, M.D., Rothberg, P.G., Diehl, R.E., Morse, C.C., Spandorfer, J.M., and Astrin, S.M. (1985). Deregulation of c-myc gene expression in human colon carcinoma is not accompanied by amplification or rearrangement of the gene. Mol Cell Biol *5*, 1969-1976.

Erisman, M.D., Scott, J.K., and Astrin, S.M. (1989). Evidence that the familial adenomatous polyposis gene is involved in a subset of colon cancers with a complementable defect in c-myc regulation. Proc Natl Acad Sci U S A *86*, 4264-4268.

Evan, G.I., Wyllie, A.H., Gilbert, C.S., Littlewood, T.D., Land, H., Brooks, M., Waters, C.M., Penn, L.Z., and Hancock, D.C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein.

Cell *69*, 119-128.

Felsher, D.W., and Bishop, J.M. (1999). Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. Mol Cell *4*, 199-207.

Felsher, D.W., Zetterberg, A., Zhu, J., Tlsty, T., and Bishop, J.M. (2000). Overexpression of MYC causes p53-dependent G2 arrest of normal fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 10544-10548.

Fernandez, P.C., Frank, S.R., Wang, L., Schroeder, M., Liu, S., Greene, J., Cocito, A., and Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. Genes Dev *17*, 1115-1129.

Foley, K.P., McArthur, G.A., Queva, C., Hurlin, P.J., Soriano, P., and Eisenman, R.N. (1998). Targeted disruption of the MYC antagonist MAD1 inhibits cell cycle exit during granulocyte differentiation. EMBO J *17*, 774-785.

Frank, S.R., Parisi, T., Taubert, S., Fernandez, P., Fuchs, M., Chan, H.M., Livingston, D.M., and Amati, B. (2003). MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. EMBO Rep *4*, 575-580.

Freiman, R.N., and Tjian, R. (2003). Regulating the regulators: lysine modifications make their mark. Cell *112*, 11-17.

Fujise, K., Zhang, D., Liu, J., and Yeh, E.T. (2000). Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. J Biol Chem *275*, 39458-39465.

Gaidano, G., Ballerini, P., Gong, J.Z., Inghirami, G., Neri, A., Newcomb, E.W., Magrath, I.T., Knowles, D.M., and Dalla-Favera, R. (1991). p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 5413-5417.

Gauwerky, C.E., Huebner, K., Isobe, M., Nowell, P.C., and Croce, C.M. (1989). Activation of MYC in a masked t(8;17) translocation results in an aggressive B-cell leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A *86*, 8867-8871.

Gebhardt, A., Frye, M., Herold, S., Benitah, S.A., Braun, K., Samans, B., Watt, F.M., Elsasser, H.P., and Eilers, M. (2006). Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. J Cell Biol *172*, 139-149.

Gebhardt, A., Kosan, C., Herkert, B., Moroy, T., Lutz, W., Eilers, M., and Elsasser, H.P. (2007). Miz1 is required for hair follicle structure and hair morphogenesis. J Cell Sci *120*, 2586-2593.

Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Schneider, J.E., Bhattacharya, S., Rideout, W.M., Bronson, R.T., Gardner, H., and Sicinski, P. (2003). Cyclin E ablation in the mouse. Cell *114*, 431-443.

Germain, M., and Duronio, V. (2007). The N terminus of the anti-apoptotic BCL-2 homologue MCL-1 regulates its localization and function. J Biol Chem *282*, 32233-32242.

Goga, A., Yang, D., Tward, A.D., Morgan, D.O., and Bishop, J.M. (2007). Inhibition of CDK1 as

a potential therapy for tumors over-expressing MYC. Nat Med *13*, 820-827.

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

Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditullio, R.A., Jr., Kastrinakis, N.G., Levy, B., *et al*. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. Nature *434*, 907-913.

Gorrini, C., Squatrito, M., Luise, C., Syed, N., Perna, D., Wark, L., Martinato, F., Sardella, D., Verrecchia, A., Bennett, S., *et al*. (2007). Tip60 is a haplo-insufficient tumour suppressor required for an oncogene-induced DNA damage response. Nature *448*, 1063-1067.

Grandori, C., Gomez-Roman, N., Felton-Edkins, Z.A., Ngouenet, C., Galloway, D.A., Eisenman, R.N., and White, R.J. (2005). c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. Nat Cell Biol *7*, 311-318.

Grandori, C., Wu, K.J., Fernandez, P., Ngouenet, C., Grim, J., Clurman, B.E., Moser, M.J., Oshima, J., Russell, D.W., Swisshelm, K., *et al*. (2003). Werner syndrome protein limits MYC-induced cellular senescence. Genes Dev *17*, 1569-1574.

Grewal, S.S., Li, L., Orian, A., Eisenman, R.N., and Edgar, B.A. (2005). Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during Drosophila development. Nat Cell Biol *7*, 295-302.

Grinberg, A.V., Hu, C.D., and Kerppola, T.K. (2004). Visualization of Myc/Max/Mad family dimers and the competition for dimerization in living cells. Mol Cell Biol *24*, 4294-4308.

Guccione, E., Martinato, F., Finocchiaro, G., Luzi, L., Tizzoni, L., Dall' Olio, V., Zardo, G., Nervi, C., Bernard, L., and Amati, B. (2006). Myc-binding-site recognition in the human genome is determined by chromatin context. Nat Cell Biol *8*, 764-770.

Ha, L., Ichikawa, T., Anver, M., Dickins, R., Lowe, S., Sharpless, N.E., Krimpenfort, P., Depinho, R.A., Bennett, D.C., Sviderskaya, E.V., *et al*. (2007). ARF functions as a melanoma tumor suppressor by inducing p53-independent senescence. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 10968-10973.

Hammoudeh, D.I., Follis, A.V., Prochownik, E.V., and Metallo, S.J. (2009). Multiple independent binding sites for small-molecule inhibitors on the oncoprotein c-Myc. J Am Chem Soc *131*, 7390-7401.

Hann, S.R., and Eisenman, R.N. (1984). Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. Mol Cell Biol *4*, 2486-2497.

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

Harris, A.W., Pinkert, C.A., Crawford, M., Langdon, W.Y., Brinster, R.L., and Adams, J.M. (1988). The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells. J Exp Med *167*, 353-371.

Herbst, A., Hemann, M.T., Tworkowski, K.A., Salghetti, S.E., Lowe, S.W., and Tansey, W.P.

(2005). A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. EMBO Rep *6*, 177-183.

Herkert, B., Dwertmann, A., Herold, S., Abed, M., Naud, J.F., Finkernagel, F., Harms, G.S., Orian, A., Wanzel, M., and Eilers, M. (2010). The Arf tumor suppressor protein inhibits Miz1 to suppress cell adhesion and induce apoptosis. J Cell Biol *188*, 905-918.

Herman, J.G., Jen, J., Merlo, A., and Baylin, S.B. (1996). Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B. Cancer Res *56*, 722-727.

Hermeking, H., and Eick, D. (1994). Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. Science *265*, 2091-2093.

Herold, S., Hock, A., Herkert, B., Berns, K., Mullenders, J., Beijersbergen, R., Bernards, R., and Eilers, M. (2008). Miz1 and HectH9 regulate the stability of the checkpoint protein, TopBP1. EMBO J *27*, 2851-2861.

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

Hsu, B., Marin, M.C., el-Naggar, A.K., Stephens, L.C., Brisbay, S., and McDonnell, T.J. (1995). Evidence that c-myc mediated apoptosis does not require wild-type p53 during lymphomagenesis. Oncogene *11*, 175-179.

Hurlin, P.J., and Huang, J. (2006). The MAX-interacting transcription factor network. Semin Cancer Biol *16*, 265-274.

Hydbring, P., Bahram, F., Su, Y., Tronnersjo, S., Hogstrand, K., von der Lehr, N., Sharifi, H.R., Lilischkis, R., Hein, N., Wu, S., *et al.* (2010). Phosphorylation by Cdk2 is required for Myc to repress Ras-induced senescence in cotransformation. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 58-63.

Iavarone, A., and Massague, J. (1997). Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15. Nature *387*, 417-422.

Ingvarsson, S., Asker, C., Axelson, H., Klein, G., and Sumegi, J. (1988). Structure and expression of B-myc, a new member of the myc gene family. Mol Cell Biol *8*, 3168-3174.

Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K., and Reimann, J.D. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. Trends Cell Biol *10*, 429-439.

Jang, E.R., Choi, J.D., Park, M.A., Jeong, G., Cho, H., and Lee, J.S. (2010). ATM modulates transcription in response to histone deacetylase inhibition as part of its DNA damage response. Exp Mol Med *42*, 195-204.

Jiang, X., Zhao, B., Britton, R., Lim, L.Y., Leong, D., Sanghera, J.S., Zhou, B.B., Piers, E., Andersen, R.J., and Roberge, M. (2004). Inhibition of Chk1 by the G2 DNA damage checkpoint inhibitor isogranulatimide. Mol Cancer Ther *3*, 1221-1227.

Johnson, N.A., Savage, K.J., Ludkovski, O., Ben-Neriah, S., Woods, R., Steidl, C., Dyer, M.J.,

Siebert, R., Kuruvilla, J., Klasa, R., *et al*. (2009). Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival. Blood *114*, 2273-2279.

Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., and Lowe, S.W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. Cell *108*, 153-164.

Juin, P., Hunt, A., Littlewood, T., Griffiths, B., Swigart, L.B., Korsmeyer, S., and Evan, G. (2002). c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. Mol Cell Biol *22*, 6158-6169.

Kaczmarek, L., Hyland, J.K., Watt, R., Rosenberg, M., and Baserga, R. (1985). Microinjected c-myc as a competence factor. Science *228*, 1313-1315.

Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G., and Sherr, C.J. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. Cell *91*, 649-659.

Karlsson, A., Deb-Basu, D., Cherry, A., Turner, S., Ford, J., and Felsher, D.W. (2003a). Defective double-strand DNA break repair and chromosomal translocations by MYC overexpression. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 9974-9979.

Karlsson, A., Giuriato, S., Tang, F., Fung-Weier, J., Levan, G., and Felsher, D.W. (2003b). Genomically complex lymphomas undergo sustained tumor regression upon MYC inactivation unless they acquire novel chromosomal translocations. Blood *101*, 2797-2803.

Ke, H., Pei, J., Ni, Z., Xia, H., Qi, H., Woods, T., Kelekar, A., and Tao, W. (2004). Putative tumor suppressor Lats2 induces apoptosis through downregulation of Bcl-2 and Bcl-x(L). Exp Cell Res *298*, 329-338.

Kelekar, A., and Thompson, C.B. (1998). Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. Trends Cell Biol 8, 324-330.

Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J., and Cheng, E.H. (2006). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. Nat Cell Biol *8*, 1348-1358.

Kim, M.H. (2008). Protein phosphatase 1 activation and alternative splicing of Bcl-X and Mcl-1 by EGCG + ibuprofen. J Cell Biochem *104*, 1491-1499.

Kim, S.Y., Herbst, A., Tworkowski, K.A., Salghetti, S.E., and Tansey, W.P. (2003). Skp2 regulates Myc protein stability and activity. Mol Cell *11*, 1177-1188.

Kime, L., and Wright, S.C. (2003). Mad4 is regulated by a transcriptional repressor complex that contains Miz-1 and c-Myc. Biochem J *370*, 291-298.

Kleine-Kohlbrecher, D., Adhikary, S., and Eilers, M. (2006). Mechanisms of transcriptional repression by Myc. Curr Top Microbiol Immunol *302*, 51-62.

Kohl, N.E., Kanda, N., Schreck, R.R., Bruns, G., Latt, S.A., Gilbert, F., and Alt, F.W. (1983). Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. Cell *35*, 359-367.

Kotha, A., Sekharam, M., Cilenti, L., Siddiquee, K., Khaled, A., Zervos, A.S., Carter, B., Turkson, J., and Jove, R. (2006). Resveratrol inhibits Src and Stat3 signaling and induces the apoptosis of malignant cells containing activated Stat3 protein. Mol Cancer Ther *5*, 621-629.

Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P., and Craig, R.W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 3516-3520.

Krimpenfort, P., Ijpenberg, A., Song, J.Y., van der Valk, M., Nawijn, M., Zevenhoven, J., and Berns, A. (2007). p15Ink4b is a critical tumour suppressor in the absence of p16Ink4a. Nature *448*, 943-946.

Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. Cell *133*, 1019-1031.

Kuroda, J., Kamitsuji, Y., Kimura, S., Ashihara, E., Kawata, E., Nakagawa, Y., Takeuichi, M., Murotani, Y., Yokota, A., Tanaka, R.*, et al*. (2008). Anti-myeloma effect of homoharringtonine with concomitant targeting of the myeloma-promoting molecules, Mcl-1, XIAP, and beta-catenin. Int J Hematol *87*, 507-515.

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

Latres, E., Malumbres, M., Sotillo, R., Martin, J., Ortega, S., Martin-Caballero, J., Flores, J.M., Cordon-Cardo, C., and Barbacid, M. (2000). Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. EMBO J *19*, 3496-3506.

Law, A., Hirayoshi, K., O'Brien, T., and Lis, J.T. (1998). Direct cloning of DNA that interacts in vivo with a specific protein: application to RNA polymerase II and sites of pausing in Drosophila. Nucleic Acids Res *26*, 919-924.

Lecanda, J., Ganapathy, V., D'Aquino-Ardalan, C., Evans, B., Cadacio, C., Ayala, A., and Gold, L.I. (2009). TGFbeta prevents proteasomal degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 for cell cycle arrest. Cell Cycle *8*, 742-756.

Leone, G., DeGregori, J., Sears, R., Jakoi, L., and Nevins, J.R. (1997). Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. Nature *387*, 422-426.

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

Li, Z., Van Calcar, S., Qu, C., Cavenee, W.K., Zhang, M.Q., and Ren, B. (2003). A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 8164-8169.

Liao, M.J., Yin, C., Barlow, C., Wynshaw-Boris, A., and van Dyke, T. (1999). Atm is dispensable for p53 apoptosis and tumor suppression triggered by cell cycle dysfunction. Mol Cell Biol *19*, 3095-3102.

Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Danielian, P.S., Parker, M.G., and Evan, G.I. (1995). A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. Nucleic Acids Res *23*, 1686-1690.

Louis, S.F., Vermolen, B.J., Garini, Y., Young, I.T., Guffei, A., Lichtensztejn, Z., Kuttler, F., Chuang, T.C., Moshir, S., Mougey, V., *et al*. (2005). c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 9613-9618.

Lowe, S.W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. Nature *432*, 307-315.
Lutterbach, B., and Hann, S.R. (1994). Hierarchical phosphorylation at N-terminal transformation-sensitive sites in c-Myc protein is regulated by mitogens and in mitosis. Mol Cell Biol *14*, 5510-5522.

MacCallum, D.E., Melville, J., Frame, S., Watt, K., Anderson, S., Gianella-Borradori, A., Lane, D.P., and Green, S.R. (2005). Seliciclib (CYC202, R-Roscovitine) induces cell death in multiple myeloma cells by inhibition of RNA polymerase II-dependent transcription and down-regulation of Mcl-1. Cancer Res *65*, 5399-5407.

Macias, E., Kim, Y., Miliani de Marval, P.L., Klein-Szanto, A., and Rodriguez-Puebla, M.L. (2007). Cdk2 deficiency decreases ras/CDK4-dependent malignant progression, but not myc-induced tumorigenesis. Cancer Res *67*, 9713-9720.

Maclean, K.H., Keller, U.B., Rodriguez-Galindo, C., Nilsson, J.A., and Cleveland, J.L. (2003). c-Myc augments gamma irradiation-induced apoptosis by suppressing Bcl-XL. Mol Cell Biol *23*, 7256-7270.

Malumbres, M., Perez de Castro, I., Santos, J., Melendez, B., Mangues, R., Serrano, M., Pellicer, A., and Fernandez-Piqueras, J. (1997). Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4b by deletion and de novo methylation with independence of p16INK4a alterations in murine primary T-cell lymphomas. Oncogene *14*, 1361-1370.

Maruyama, K., Schiavi, S.C., Huse, W., Johnson, G.L., and Ruley, H.E. (1987). myc and E1A oncogenes alter the responses of PC12 cells to nerve growth factor and block differentiation. Oncogene *1*, 361-367.

Massague, J., Blain, S.W., and Lo, R.S. (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. Cell *103*, 295-309.

Massague, J. (2008). TGFbeta in Cancer. Cell *134*, 215-230.

Mateyak, M.K., Obaya, A.J., Adachi, S., and Sedivy, J.M. (1997). Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. Cell Growth Differ *8*, 1039-1048.

Mateyak, M.K., Obaya, A.J., and Sedivy, J.M. (1999). c-Myc regulates cyclin D-Cdk4 and -Cdk6 activity but affects cell cycle progression at multiple independent points. Mol Cell Biol *19*, 4672-4683.

Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., *et al*. (2007). ATM and ATR substrate

analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. Science *316*, 1160-1166.

McMahon, S.B., Wood, M.A., and Cole, M.D. (2000). The essential cofactor TRRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. Mol Cell Biol *20*, 556-562.

Meriin, A.B., Gabai, V.L., Yaglom, J., Shifrin, V.I., and Sherman, M.Y. (1998). Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. J Biol Chem *273*, 6373-6379.

Meyer, N., and Penn, L.Z. (2008). Reflecting on 25 years with MYC. Nat Rev Cancer *8*, 976-990.

Miao, L., Song, Z., Jin, L., Zhu, Y.M., Wen, L.P., and Wu, M. (2010). ARF antagonizes the ability of Miz-1 to inhibit p53-mediated transactivation. Oncogene *29*, 711-722.

Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. Nature *436*, 720-724.

Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U.M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. Mol Cell *11*, 577-590.

Mitchell, K.O., Ricci, M.S., Miyashita, T., Dicker, D.T., Jin, Z., Reed, J.C., and El-Deiry, W.S. (2000). Bax is a transcriptional target and mediator of c-myc-induced apoptosis. Cancer Res *60*, 6318-6325.

Miyashita, T., and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell *80*, 293-299.

Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2006). Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. N Engl J Med *355*, 1037-1046.

Mu, J.J., Wang, Y., Luo, H., Leng, M., Zhang, J., Yang, T., Besusso, D., Jung, S.Y., and Qin, J. (2007). A proteomic analysis of ataxia telangiectasia-mutated (ATM)/ATM-Rad3-related (ATR) substrates identifies the ubiquitin-proteasome system as a regulator for DNA damage checkpoints. J Biol Chem *282*, 17330-17334.

Muratani, M., and Tansey, W.P. (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. Nat Rev Mol Cell Biol *4*, 192-201.

Murphy, D.J., Junttila, M.R., Pouyet, L., Karnezis, A., Shchors, K., Bui, D.A., Brown-Swigart, L., Johnson, L., and Evan, G.I. (2008). Distinct thresholds govern Myc's biological output in vivo. Cancer Cell *14*, 447-457.

Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., *et al*. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. Cell *58*, 537-544.

Nagahara, H., Ezhevsky, S.A., Vocero-Akbani, A.M., Kaldis, P., Solomon, M.J., and Dowdy, S.F. (1999). Transforming growth factor beta targeted inactivation of cyclin E:cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) complexes by inhibition of Cdk2 activating kinase activity. Proc Natl Acad Sci U S A

96, 14961-14966.

Nakano, K., and Vousden, K.H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. Mol Cell *7*, 683-694.

Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. Cell *113*, 703-716.

Nau, M.M., Brooks, B.J., Battey, J., Sausville, E., Gazdar, A.F., Kirsch, I.R., McBride, O.W., Bertness, V., Hollis, G.F., and Minna, J.D. (1985). L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. Nature *318*, 69-73.

Nguyen, M., Marcellus, R.C., Roulston, A., Watson, M., Serfass, L., Murthy Madiraju, S.R., Goulet, D., Viallet, J., Belec, L., Billot, X., *et al*. (2007). Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 19512-19517.

Nieminen, A.I., Partanen, J.I., Hau, A., and Klefstrom, J. (2007). c-Myc primed mitochondria determine cellular sensitivity to TRAIL-induced apoptosis. EMBO J *26*, 1055-1067.

Nilsson, J.A., Maclean, K.H., Keller, U.B., Pendeville, H., Baudino, T.A., and Cleveland, J.L. (2004). Mnt loss triggers Myc transcription targets, proliferation, apoptosis, and transformation. Mol Cell Biol *24*, 1560-1569.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. Science *288*, 1053-1058.

O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Mendell, J.T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature *435*, 839-843.

O'Neil, J., and Look, A.T. (2007). Mechanisms of transcription factor deregulation in lymphoid cell transformation. Oncogene *26*, 6838-6849.

Ortega, S., Prieto, I., Odajima, J., Martin, A., Dubus, P., Sotillo, R., Barbero, J.L., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. Nat Genet *35*, 25-31.

Paoluzzi, L., Gonen, M., Gardner, J.R., Mastrella, J., Yang, D., Holmlund, J., Sorensen, M., Leopold, L., Manova, K., Marcucci, G., *et al*. (2008). Targeting Bcl-2 family members with the BH3 mimetic AT-101 markedly enhances the therapeutic effects of chemotherapeutic agents in in vitro and in vivo models of B-cell lymphoma. Blood *111*, 5350-5358.

Patel, J.H., and McMahon, S.B. (2006). Targeting of Miz-1 is essential for Myc-mediated apoptosis. J Biol Chem *281*, 3283-3289.

Patel, J.H., and McMahon, S.B. (2007). BCL2 is a downstream effector of MIZ-1 essential for blocking c-MYC-induced apoptosis. J Biol Chem *282*, 5-13.

Payne, G.S., Bishop, J.M., and Varmus, H.E. (1982). Multiple arrangements of viral DNA and an

activated host oncogene in bursal lymphomas. Nature *295*, 209-214.

Pearson, J.C., Lemons, D., and McGinnis, W. (2005). Modulating Hox gene functions during animal body patterning. Nat Rev Genet *6*, 893-904.

Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G., and Evan, G. (1999). Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. Mol Cell *3*, 565-577.

Pelisson, I., Soler, C., Pechoux, C., Chignol, M.C., Viac, J., Euvrard, S., and Chardonnet, Y. (1992). c-myc and c-Ha-ras cellular oncogenes and human papillomaviruses in benign and malignant cutaneous lesions. J Dermatol Sci *3*, 56-67.

Penn, L.J., Brooks, M.W., Laufer, E.M., and Land, H. (1990). Negative autoregulation of c-myc transcription. EMBO J *9*, 1113-1121.

Perez-Roger, I., Kim, S.H., Griffiths, B., Sewing, A., and Land, H. (1999). Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). EMBO J *18*, 5310-5320.

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

Popov, N., Wanzel, M., Madiredjo, M., Zhang, D., Beijersbergen, R., Bernards, R., Moll, R., Elledge, S.J., and Eilers, M. (2007). The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability. Nat Cell Biol *9*, 765-774.

Price, D.H. (2008). Poised polymerases: on your mark...get set...go! Mol Cell *30*, 7-10.

Prochownik, E.V., and Li, Y. (2007). The ever expanding role for c-Myc in promoting genomic instability. Cell Cycle *6*, 1024-1029.

Pusapati, R.V., Rounbehler, R.J., Hong, S., Powers, J.T., Yan, M., Kiguchi, K., McArthur, M.J., Wong, P.K., and Johnson, D.G. (2006). ATM promotes apoptosis and suppresses tumorigenesis in response to Myc. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 1446-1451.

Queva, C., McArthur, G.A., Iritani, B.M., and Eisenman, R.N. (2001). Targeted deletion of the S-phase-specific Myc antagonist Mad3 sensitizes neuronal and lymphoid cells to radiation-induced apoptosis. Mol Cell Biol *21*, 703-712.

Rahl, P.B., Lin, C.Y., Seila, A.C., Flynn, R.A., McCuine, S., Burge, C.B., Sharp, P.A., and Young, R.A. (2010). c-Myc regulates transcriptional pause release. Cell *141*, 432-445.

Rahmani, M., Davis, E.M., Bauer, C., Dent, P., and Grant, S. (2005). Apoptosis induced by the kinase inhibitor BAY 43-9006 in human leukemia cells involves down-regulation of Mcl-1 through inhibition of translation. J Biol Chem *280*, 35217-35227.

Reimann, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Dorr, J.R., Tabor, V., Aichele, P., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C.A. (2010). Tumor stroma-derived TGF-beta limits myc-driven lymphomagenesis via Suv39h1-dependent senescence. Cancer Cell *17*, 262-272.

Reimann, M., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Schildhauer, I., Teichmann, B., Stein, H., Schlegelberger, B., Dorken, B., and Schmitt, C.A. (2007). The Myc-evoked DNA damage response accounts for treatment resistance in primary lymphomas in vivo. Blood *110*, 2996-3004.

Riabowol, K., Draetta, G., Brizuela, L., Vandre, D., and Beach, D. (1989). The cdc2 kinase is a nuclear protein that is essential for mitosis in mammalian cells. Cell *57*, 393-401.

Ricci, M.S., Kim, S.H., Ogi, K., Plastaras, J.P., Ling, J., Wang, W., Jin, Z., Liu, Y.Y., Dicker, D.T., Chiao, P.J., *et al*. (2007). Reduction of TRAIL-induced Mcl-1 and cIAP2 by c-Myc or sorafenib sensitizes resistant human cancer cells to TRAIL-induced death. Cancer Cell *12*, 66-80.

Roberge, M., Berlinck, R.G., Xu, L., Anderson, H.J., Lim, L.Y., Curman, D., Stringer, C.M., Friend, S.H., Davies, P., Vincent, I., *et al*. (1998). High-throughput assay for G2 checkpoint inhibitors and identification of the structurally novel compound isogranulatimide. Cancer Res *58*, 5701-5706.

Robinson, K., Asawachaicharn, N., Galloway, D.A., and Grandori, C. (2009). c-Myc accelerates S-Phase and requires WRN to avoid replication stress. PLoS One *4*, e5951

Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. Science *234*, 364-368

Saito, M., Novak, U., Piovan, E., Basso, K., Sumazin, P., Schneider, C., Crespo, M., Shen, Q., Bhagat, G., Califano, A., *et al*. (2009). BCL6 suppression of BCL2 via Miz1 and its disruption in diffuse large B cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 11294-11299.

Sakamuro, D., Eviner, V., Elliott, K.J., Showe, L., White, E., and Prendergast, G.C. (1995). c-Myc induces apoptosis in epithelial cells by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. Oncogene *11*, 2411-2418.

Sarkaria, J.N., Busby, E.C., Tibbetts, R.S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L.M., and Abraham, R.T. (1999). Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. Cancer Res *59*, 4375-4382.

Saunders, A., Core, L.J., and Lis, J.T. (2006). Breaking barriers to transcription elongation. Nat Rev Mol Cell Biol *7*, 557-567.

Sawey, M.J., Hood, A.T., Burns, F.J., and Garte, S.J. (1987). Activation of c-myc and c-K-ras oncogenes in primary rat tumors induced by ionizing radiation. Mol Cell Biol *7*, 932-935.

Schmitt, C.A., McCurrach, M.E., de Stanchina, E., Wallace-Brodeur, R.R., and Lowe, S.W. (1999). INK4a/ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53. Genes Dev *13*, 2670-2677.

Schneider, A., Peukert, K., Eilers, M., and Hanel, F. (1997). Association of Myc with the zinc-finger protein Miz-1 defines a novel pathway for gene regulation by Myc. Curr Top Microbiol Immunol *224*, 137-146.

Schreiber-Agus, N., Meng, Y., Hoang, T., Hou, H., Jr., Chen, K., Greenberg, R., Cordon-Cardo, C., Lee, H.W., and DePinho, R.A. (1998). Role of Mxi1 in ageing organ systems and the regulation of normal and neoplastic growth. Nature *393*, 483-487.

Schreiber-Agus, N., Stein, D., Chen, K., Goltz, J.S., Stevens, L., and DePinho, R.A. (1997). Drosophila Myc is oncogenic in mammalian cells and plays a role in the diminutive phenotype. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 1235-1240.

Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K.H., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Gilbert, F., Brodeur, G., Goldstein, M., and Trent, J. (1983). Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. Nature *305*, 245-248.

Schwer, B., Mao, X., and Shuman, S. (1998). Accelerated mRNA decay in conditional mutants of yeast mRNA capping enzyme. Nucleic Acids Res *26*, 2050-2057.

Schwickart, M., Huang, X., Lill, J.R., Liu, J., Ferrando, R., French, D.M., Maecker, H., O'Rourke, K., Bazan, F., Eastham-Anderson, J., *et al*. (2010). Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. Nature *463*, 103-107.

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

Seoane, J., Le, H.V., and 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., and Massague, J. (2001). TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. Nat Cell Biol *3*, 400-408.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. Cell *88*, 593-602.

Shatkin, A.J. (1976). Capping of eucaryotic mRNAs. Cell *9*, 645-653.

Shi, Y., Glynn, J.M., Guilbert, L.J., Cotter, T.G., Bissonnette, R.P., and Green, D.R. (1992). Role for c-myc in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. Science *257*, 212-214.

Shmueli, A., and Oren, M. (2005). Life, death, and ubiquitin: taming the mule. Cell *121*, 963-965.

Singh, G., Singh, S.K., Konig, A., Reutlinger, K., Nye, M.D., Adhikary, T., Eilers, M., Gress, T.M., Fernandez-Zapico, M.E., and Ellenrieder, V. (2010). Sequential activation of NFAT and c-MYC transcription factors mediates the TGF{beta} switch from a suppressor to a promoter of cancer cell proliferation. J Biol Chem.

Sjostrom, S.K., Finn, G., Hahn, W.C., Rowitch, D.H., and Kenney, A.M. (2005). The Cdk1 complex plays a prime role in regulating N-myc phosphorylation and turnover in neural precursors. Dev Cell *9*, 327-338.

Soucek, L., Whitfield, J., Martins, C.P., Finch, A.J., Murphy, D.J., Sodir, N.M., Karnezis, A.N., Swigart, L.B., Nasi, S., and Evan, G.I. (2008). Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. Nature *455*, 679-683.

Soucie, E.L., Annis, M.G., Sedivy, J., Filmus, J., Leber, B., Andrews, D.W., and Penn, L.Z. (2001). Myc potentiates apoptosis by stimulating Bax activity at the mitochondria. Mol Cell Biol *21*, 4725-4736.

Spotts, G.D., Patel, S.V., Xiao, Q., and Hann, S.R. (1997). Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins. Mol Cell Biol *17*, 1459-1468.

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

Steiger, D., Furrer, M., Schwinkendorf, D., and Gallant, P. (2008). Max-independent functions of Myc in Drosophila melanogaster. Nat Genet *40*, 1084-1091.

Sterner, D.E., and Berger, S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. Microbiol Mol Biol Rev *64*, 435-459.

Stewart, D.P., Koss, B., Bathina, M., Perciavalle, R.M., Bisanz, K., and Opferman, J.T. (2010). Ubiquitin-independent degradation of antiapoptotic MCL-1. Mol Cell Biol *30*, 3099-3110.

Stone, S., Dayananth, P., Jiang, P., Weaver-Feldhaus, J.M., Tavtigian, S.V., Cannon-Albright, L., and Kamb, A. (1995). Genomic structure, expression and mutational analysis of the P15 (MTS2) gene. Oncogene *11*, 987-991.

Strausfeld, U., Labbe, J.C., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Picard, A., Sadhu, K., Russell, P., and Doree, M. (1991). Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. Nature *351*, 242-245.

Sugiyama, A., Kume, A., Nemoto, K., Lee, S.Y., Asami, Y., Nemoto, F., Nishimura, S., and Kuchino, Y. (1989). Isolation and characterization of s-myc, a member of the rat myc gene family. Proc Natl Acad Sci U S A *86*, 9144-9148.

Takebe, Y., Seiki, M., Fujisawa, J., Hoy, P., Yokota, K., Arai, K., Yoshida, M., and Arai, N. (1988). SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. Mol Cell Biol *8*, 466-472.

Tang, R., Faussat, A.M., Majdak, P., Marzac, C., Dubrulle, S., Marjanovic, Z., Legrand, O., and Marie, J.P. (2006). Semisynthetic homoharringtonine induces apoptosis via inhibition of protein synthesis and triggers rapid myeloid cell leukemia-1 down-regulation in myeloid leukemia cells. Mol Cancer Ther *5*, 723-731.

Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., and Leder, P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A *79*, 7837-7841.

Thomas, D.A., and Massague, J. (2005). TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. Cancer Cell *8*, 369-380.

Timofeev, O., Cizmecioglu, O., Settele, F., Kempf, T., and Hoffmann, I. (2010). Cdc25

phosphatases are required for timely assembly of CDK1-cyclin B at the G2/M transition. J Biol Chem *285*, 16978-16990.

Treszl, A., Adany, R., Rakosy, Z., Kardos, L., Begany, A., Gilde, K., and Balazs, M. (2004). Extra copies of c-myc are more pronounced in nodular melanomas than in superficial spreading melanomas as revealed by fluorescence in situ hybridisation. Cytometry B Clin Cytom *60*, 37-46.

Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T.K., Hampton, G.M., and Wahl, G.M. (2002). c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. Mol Cell *9*, 1031-1044.

van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Batlle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.P., *et al.* (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. Cell *111*, 241-250.

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

Verhagen, A.M., and Vaux, D.L. (2002). Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. Apoptosis *7*, 163-166.

Vervoorts, J., Luscher-Firzlaff, J.M., Rottmann, S., Lilischkis, R., Walsemann, G., Dohmann, K., Austen, M., and Luscher, B. (2003). Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. EMBO Rep *4*, 484-490.

Vita, M., and Henriksson, M. (2006). The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. Semin Cancer Biol *16*, 318-330.

von der Lehr, N., Johansson, S., Wu, S., Bahram, F., Castell, A., Cetinkaya, C., Hydbring, P., Weidung, I., Nakayama, K., Nakayama, K.I., *et al.* (2003). The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteosomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription. Mol Cell *11*, 1189-1200.

Wade, M., and Wahl, G.M. (2006). c-Myc, genome instability, and tumorigenesis: the devil is in the details. Curr Top Microbiol Immunol *302*, 169-203.

Wagner, A.J., Kokontis, J.M., and Hay, N. (1994). Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21waf1/cip1. Genes Dev *8*, 2817-2830.

Wang, H., Hammoudeh, D.I., Follis, A.V., Reese, B.E., Lazo, J.S., Metallo, S.J., and Prochownik, E.V. (2007). Improved low molecular weight Myc-Max inhibitors. Mol Cancer Ther *6*, 2399-2408.

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

Wanzel, M., Russ, A.C., Kleine-Kohlbrecher, D., Colombo, E., Pelicci, P.G., and Eilers, M.

(2008). A ribosomal protein L23-nucleophosmin circuit coordinates Mizl function with cell growth. Nat Cell Biol *10*, 1051-1061.

Weeks, C.E., Herrmann, A.L., Nelson, F.R., and Slaga, T.J. (1982). alpha-Difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, inhibits tumor promoter-induced polyamine accumulation and carcinogenesis in mouse skin. Proc Natl Acad Sci U S A *79*, 6028-6032.

Weinberg, ed. (2007). The Biology of Cancer (New York, Abingdon, Taylor & Francis group).

Welcker, M., and Clurman, B.E. (2008). FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. Nat Rev Cancer *8*, 83-93.

Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M., and Huang, D.C. (2005). Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. Genes Dev *19*, 1294-1305.

Woodford-Richens, K.L., Rowan, A.J., Gorman, P., Halford, S., Bicknell, D.C., Wasan, H.S., Roylance, R.R., Bodmer, W.F., and Tomlinson, I.P. (2001). SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 9719-9723.

Wu, C.H., van Riggelen, J., Yetil, A., Fan, A.C., Bachireddy, P., and Felsher, D.W. (2007). Cellular senescence is an important mechanism of tumor regression upon c-Myc inactivation. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 13028-13033.

Wu, S., Cetinkaya, C., Munoz-Alonso, M.J., von der Lehr, N., Bahram, F., Beuger, V., Eilers, M., Leon, J., and Larsson, L.G. (2003). Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. Oncogene *22*, 351-360.

Wu, S., Hultquist, A., Hydbring, P., Cetinkaya, C., Oberg, F., and Larsson, L.G. (2009). TGF-beta enforces senescence in Myc-transformed hematopoietic tumor cells through induction of Mad1 and repression of Myc activity. Exp Cell Res *315*, 3099-3111.

Xiang, Z., Luo, H., Payton, J.E., Cain, J., Ley, T.J., Opferman, J.T., and Tomasson, M.H. (2010). Mcl1 haploinsufficiency protects mice from Myc-induced acute myeloid leukemia. J Clin Invest *120*, 2109-2118.

Yeh, E., Cunningham, M., Arnold, H., Chasse, D., Monteith, T., Ivaldi, G., Hahn, W.C., Stukenberg, P.T., Shenolikar, S., Uchida, T., *et al*. (2004). A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. Nat Cell Biol *6*, 308-318.

Yin, X.Y., Grove, L., Datta, N.S., Long, M.W., and Prochownik, E.V. (1999). C-myc overexpression and p53 loss cooperate to promote genomic instability. Oncogene *18*, 1177-1184.

Zhan, Q., Bieszczad, C.K., Bae, I., Fornace, A.J., Jr., and Craig, R.W. (1997). Induction of BCL2 family member MCL1 as an early response to DNA damage. Oncogene *14*, 1031-1039.

Zhao, X., D, D.A., Lim, W.K., Brahmachary, M., Carro, M.S., Ludwig, T., Cardo, C.C., Guillemot, F., Aldape, K., Califano, A., *et al*. (2009). The N-Myc-DLL3 cascade is suppressed by the ubiquitin ligase Huwe1 to inhibit proliferation and promote neurogenesis in the developing

brain. Dev Cell *17*, 210-221.

Zhao, X., Heng, J.I., Guardavaccaro, D., Jiang, R., Pagano, M., Guillemot, F., Iavarone, A., and Lasorella, A. (2008). The HECT-domain ubiquitin ligase Huwe1 controls neural differentiation and proliferation by destabilizing the N-Myc oncoprotein. Nat Cell Biol *10*, 643-653.

Zhao, Y., Altman, B.J., Coloff, J.L., Herman, C.E., Jacobs, S.R., Wieman, H.L., Wofford, J.A., Dimascio, L.N., Ilkayeva, O., Kelekar, A.*, et al*. (2007). Glycogen synthase kinase 3alpha and 3beta mediate a glucose-sensitive antiapoptotic signaling pathway to stabilize Mcl-1. Mol Cell Biol *27*, 4328-4339.

Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. (2005). Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. Cell *121*, 1085-1095.

Zhuang, D., Mannava, S., Grachtchouk, V., Tang, W.H., Patil, S., Wawrzyniak, J.A., Berman, A.E., Giordano, T.J., Prochownik, E.V., Soengas, M.S.*, et al*. (2008). C-MYC overexpression is required for continuous suppression of oncogene-induced senescence in melanoma cells. Oncogene *27*, 6623-6634.

Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. (1998). Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. Genes Dev *12*, 2424-2433.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
AEC	3-Amino-9-etylcabazol
AK	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Amminiumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Atm	Ataxia Telangiectasia Mutated
Atr	Atm- and Rad3-Related
B2M	β2-Mikroglobulin
bHLH-LZ	basischer Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-Terminus	Carboxyterminus
ca.	zirka
CD	*cluster of differentiation*
CD4	Oberflächenantigen von T-Helferzellen
CD8	Oberflächenantigen von zytotoxischen T-Zellen
Cdk	Cyklin abhängige Kinase (*cycline dependent kinase*)
cDNA	*copy* DNA
CDS	kodierende Sequenz (*coding sequence*)
CHX	Cycloheximid
CMV	Zytomegalovirus
d	Tag (Stone *et al.*)
D	Aspartat
Da	Dalton
DMSO	Diethylpyrocarbonat
DTT	Dithiothreitol
d.h.	das heißt
ddH_2O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagel Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSB	DNA Doppelstrang Bruch
DTT	Dithiothreitol
E-Box	
E3	Ubiquitinligase
EB	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (*ethylenediaminetetraacetic acid*)
EtOH	Ethanol

ES-Zellen	embryonale Stammzellen
et al.	und andere (*et altera*)
Eμ	Enhancer der schweren Immunglobulinkette
FACS	Durchflusszytometrie (*Fluorescence-activated cell sorting)*
FBS	fötales Rinderserum (*foetal bovine serum*)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gravitationskonstante
G	Guanin
GTP	Guanin-Nukleotid-Triphosphat
h	Stunden (*hours*)
H	
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung (*HEPES buffered saline*)
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich Peroxidase (*horseradish peroxidase*)
IF	Immunfluoreszenz
IGR	Isogranulatimide
IHC	Immunhistochemie
INR	Initiatorelement
IP	Immunpräzipitation
IL	Interleukin
K	Lysin
kD	Kilodalton
Ktr	Kontrolle
LB	Medium zur Bakterienkultivierung (*lysogeny broth*)
LOH	Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*)
LTR	*long terminal repeat*
M	molar
Mef	Maus Embryo Fibroblasten
MEM	Minimum Essential Medium
MeOH	Methanol
MG-132	N-(benzyloxycarbonyl)leucinylleucinylleucinal
mg	Milligramm
miRNA	microRNA
min	Minuten
Mio	Millionen
ml	Milliliter
MoMuLV	*Moloney murine leukemia virus*
mRNA	BotenRNA (*messenger* RNA)
MSCV	*Murine stem cell virus*
mut	mutiert
N-Terminus	Aminoterminus
NEM	N-Ethylmaleimid
NLS	Kernlokalisationssignal (*nuclear localization signal*)
nM	nanomolar
nm	Nanometer
NP40	Nonidet P-40
OHT	4-Hydroxytamoxifen
OIS	Onkogen induzierte Seneszenz
p	Protein
p	phospho

PBS	Phospat Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
Pfa	Paraformaldehyd
PI	Propidiumjodid
PI	Phosphatase Inhibitor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
polyA	Polyadenylierungssignal
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative reverse Echtzeit PCR
RIPA	*radioimmunoprecipitation assay*
RNA	Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*)
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*)
rpm	Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase
SA-β-Gal	Seneszenz-assoziierte-β-Galaktosidase
SDS	Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate)*
sec	Sekunde (*second*)
Ser	Serin
shRNA	*short-hairpin* RNA
siRNA	*short-interference* RNA
T	Thymin
Tab	Tabelle
TBS-T	tris-buffered saline Tween-20 TAE
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
tetO	Tetrazyklin-regulierter Operator
TGFβ	transformierender Wachstumsfaktor β (*transforming growth factor β*)
Thr	Threonin
TNN	Tris-HCl, NaCl, Nonidet P-40
TRAIL	*TNF-related apoptosis-inducing ligand*
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tritin-X-100	Octylphenoxypolyethoxyethanol
TUNEL	*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*
Tween-20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat
Tyr	Tyrosin
TβR-II-ED	Ectodomäne des humanen TGFβ-Rezeptor 2
u.a.	unter Anderem
U	Aktivitätseinheit (*unit*)
U	Uracil
Ubi	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v/v	Volumen/Volumenverhältnis
w/v	Gewichts/-Volumenverhältnis
wt	wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside
µl	Mikroliter

9.3 Publikationen

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgendem Artikel veröffentlicht:

J van Riggelen[1], J Müller[1], T Otto[1],V Beuger, B Samans, A Yetil, J Tao, P Choi, Ch Kosan, T Möröy, D Felsher and M Eilers
[1] gleichberechtigte Erstautoren
„The interaction between Myc and Miz1 is required to antagonize TGFβ-dependent autocrine signaling during lymphoma formation and maintenance “
Genes and Development , 2010 Jun 15

Ein weiterer Teil der Arbeit wird als Manuskript für Cell Cycle vorbereitet:

J Müller, J van Riggelen, B Samans, D Felsher and M Eilers
The senescent phenotype is accompanied by occurrence of TGFbeta dependent differentiation
in Bearbeitung für Cell Cycle

9.4 Danksagung

Prof. Dr. Martin Eilers möchte ich danken für die Bereitstellung der interessanten Themen, andauernde Unterstützung und die ständige Bereitschaft Ergebnisse zu diskutieren. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Manfred Schartl, dass er spontan die Betreuung meiner Arbeit aus der Fakultät Biologie der Universität Würzburg übernommen hat.

Ich möchte mich bei allen momentanen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe aus Marburg und Würzburg für die Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken. Namentlich erwähnen möchte ich Mona Meyer, mit der ich einen denkwürdigen Aufenthalt in Caddenabia genießen durfte und die mir von der Zeit in Marburg immer in Erinnerung bleiben wird. Katrin Wiese danke ich für die schnelle und sorgfältige Korrektur meiner schriftlichen Arbeit. Barbara Herkert danke ich für einige Kaffeepausen und die Bereitschaft für wissenschaftliche sowie private Diskussionen. Tobias Otto danke ich für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit am Mausprojekt. Birgit Samans danke ich für die Hilfestellung bei statistischen Auswertungen. Antje Grzeschiczek, Waltraud Ackermann, Angela Grün und Barbara Bauer danke ich für technische Unterstützung. Elmar Wolf danke ich für seine Hilfe beim Formatieren und Drucken der Arbeit.

Andrea Schüler danke ich dafür, dass sie meine Arbeit gelesen und kritisch korrigiert hat und dafür dass mit ihr wissenschaftliche Diskussionen aus einer anderen Perspektive auch unabhängig von Myc möglich waren.

Weiterhin gilt mein Dank meiner Familie, die mich nicht nur finanziell unterstützt hat, sondern der es immer wieder gelang, mich zu motivieren. Mein besonderer Dank geht an Flo, der alle Höhen und Tiefen, die während der Entstehung dieser Arbeit auftraten, mitmachen musste und der trotzdem noch immer für mich da ist.

9.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation zu den Themen

Die Rolle der HectH9/Mcl1-Interaktion bei der Vermittlung der Myc-induzierten Apoptose

und

Auswirkungen der MycV394D-Mutation auf die von c-Myc gesteuerte Tumorgenese in einem transgenen Mausmodell

unter Leitung von Prof. Dr. Martin Eilers selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe mich dabei keiner anderen als von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient.

Die Dissertation wurde in der jetztigen oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat auch ansonsten zu keinen Prüfungszwecken gedient.

Judith Müller Würzburg, den 27.Oktober 2010