



**Die Regulation von Fbw7 durch PI3K-abhängige Phosphorylierung
und
Charakterisierung eines konditionalen Usp28-Knockout-Mausmodells**

**Regulation of Fbw7 by PI3K-dependent phosphorylation
and
Characterization of a Usp28 conditional knockout mouse**

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

vorgelegt von

Christina Schüle

aus

Kronach

Würzburg 2011

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Manfred Gessler

1. Betreuer: Prof. Dr. Martin Eilers

2. Betreuer: Prof. Dr. Dr. Manfred Scharl

3. Betreuer: Prof. Dr. Stefan Gaubatz

4. Betreuer: Prof. Dr. Thorsten Hoppe

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	2
3	Einleitung	3
3.1	Der onkogene Transkriptionsfaktor Myc	3
3.2	Die Familie der Myc-Proteine	4
3.3	Der Aufbau des c-Myc-Proteins	4
3.4	Funktionen von c-Myc	5
3.5	Die Regulation von c-Myc	8
3.5.1	Transkriptionelle Regulation von c-Myc	8
3.5.2	Post-transkriptionelle Regulation von c-Myc	10
3.5.2.1	mRNA-Stabilität	10
3.5.3	Translation	10
3.5.4	Proteinstabilität	11
3.6	Proteinabbau	13
3.6.1	Das Ubiquitin-Proteasom-System	13
3.6.2	Fbw7	17
3.6.3	Usp28	18
3.7	Zielsetzung dieser Arbeit	20
4	Materialien	21
4.1	Stämme und Zelllinien	21
4.1.1	Bakterienstämme	21
4.1.2	Säugerzelllinien	21
4.1.3	Primäre Zellen	22
4.1.4	Transgene Mausstämme	22

4.2	Kultivierungsmedien und Zusätze	23
4.2.1	Medien und Antibiotika zur Bakterienkultivierung	23
4.2.1.1	Medien	23
4.2.1.2	Antibiotika	23
4.2.2	Medien und Zusätze für die Säugerzellkultivierung	23
4.2.2.1	Medien	23
4.2.2.2	Antibiotika	24
4.2.2.3	Weitere Zusätze	24
4.3	Nukleinsäuren	25
4.3.1	Primer	25
4.3.2	Plasmide	27
4.3.2.1	Leervektoren	27
4.3.2.2	Expressionsvektoren	27
4.4	Antikörper	29
4.4.1	Primärantikörper	29
4.4.2	Sekundärantikörper	30
4.5	Chemikalien	30
4.6	Standards und Enzyme	31
4.6.1	Standards	31
4.6.2	Enzyme und Kits	31
4.7	Puffer und Lösungen	31
4.8	Gebrauchsmaterialien	35
4.9	Geräte, Membranen und Filme	35
5	Methoden	37
5.1	Molekularbiologische Methoden	37

5.1.1	Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmidamplifikation	37
5.1.2	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	37
5.1.3	Isolierung von genomischer DNA aus Mausproben und Zellkulturzellen	38
5.1.4	Messung von Nukleinsäurekonzentrationen	38
5.1.5	Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA (Restriktion)	38
5.1.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	39
5.1.7	DNA-Extraktion aus einem Agarosegel	39
5.1.8	Ligation von DNA-Fragmenten	39
5.1.9	Isolation von RNA	40
5.1.10	cDNA-Synthese	40
5.1.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
5.2	Zellbiologische Methoden	43
5.2.1	Auftauen von Zellen	44
5.2.2	Passagieren von Zellen	44
5.2.3	Einfrieren von Zellen	44
5.2.4	Transfektion von Plasmid-DNA	45
5.2.4.1	Komplexierung von DNA mit Kalziumphosphat	45
5.2.4.2	Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)	45
5.2.5	Retrovirale Infektion von Säugerzellen	46
5.2.6	Behandlung von Zellen mit UVB-Strahlung	47
5.2.7	Kumulative Wachstumskurve	47
5.2.8	Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (PI-FACS)	47
5.2.9	Kristallviolett-färbung	48
5.2.10	Färbung von seneszenten Zellen (saure β -Galaktosidase)	48

5.3	Proteinbiochemische Methoden	49
5.3.1	Bakterielle Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	49
5.3.2	Herstellung von Gesamtzellproteinlysaten	50
5.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	50
5.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
5.3.5	Nachweis von Proteinen im Polyacrylamid-Gel durch Coomassie-Färbung	51
5.3.6	Western Blot	51
5.3.7	Strippen von PVDF-Membranen	52
5.3.8	Bestimmung der Proteinhalbwertszeit	52
5.3.9	Radioaktive Analyse der Kinaseaktivität <i>in vitro</i>	52
5.3.10	Immunpräzipitation	53
5.3.11	Denaturierende Immunpräzipitation	53
5.3.12	<i>In vivo</i> Ubiquitinierungsuntersuchung	54
5.3.13	Indirekte Immunfluoreszenz	54
5.4	Tierexperimentelle Methoden	55
5.4.1	Zucht von Mäusen	55
5.4.2	Entnahme von Mausembryonen und Isolierung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)	55
5.4.3	Intraperitoneale Injektion von Mäusen	56
5.4.4	Organentnahme bei Mäusen	56
5.4.5	Isolierung von B-Zellen	56
6	Ergebnisse	57
6.1	Die Regulation von Fbw7 durch PI3K-abhängige Phosphorylierung	57
6.1.1	Serin 227 in Fbw7 wird PI3K-abhängig phosphoryliert	57

6.1.2 Akt phosphoryliert Fbw7 α nicht <i>in vitro</i>	60
6.1.3 Die Phosphorylierung von Serin 227 in Fbw7 beeinflusst sowohl die Stabilität von Fbw7-Substraten als auch von Fbw7 selbst	62
6.1.4 Die Phosphorylierung von Serin 227 hat keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation und auf bekannte Interaktionen von Fbw7	65
6.1.5 Die Phosphorylierung von Serin 227 ist notwendig für die biologische Aktivität von Fbw7	68
6.2 Die Validierung von Usp28 als therapeutisches Zielprotein in Myc-induzierten Tumoren	71
6.2.1 Etablierung eines konditionalen <i>Knockout</i> -Mausmodells für Usp28	71
6.2.2 Die retrovirale Infektion von MEFs mit einer Cre-Rekombinase führt zur Deletion von Usp28, reduziert aber weder Myc-Proteinlevel noch Proliferation	74
6.2.3 Die Aktivierung der Rosa26-CreER ^{T2} in Usp28 fl/fl-Mäusen führt zu einer partiellen Deletion von Usp28 in verschiedenen Organen	76
6.2.4 Die Aktivierung der Rosa26-CreER ^{T2} führt zu einer effizienten Deletion von Usp28 in murinen embryonalen Fibroblasten, beeinflusst allerdings weder Myc-Proteinlevel noch Proliferation	79
6.2.5 Der akute Verlust von Usp28 in murinen embryonalen Fibroblasten hat keinen Einfluss auf die Proteinstabilität von Myc oder die DNA-Schadensantwort	82
6.2.6 Keimbahndeletion von Usp28 durch eine Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Zp3-Promotors	84
6.2.7 Die Keimbahndeletion von Usp28 durch Zp3-Cre ist in allen untersuchten Organen sehr effizient; die Mäuse sind lebensfähig, fertil und phänotypisch unauffällig	86
6.2.8 Charakterisierung von murinen embryonalen Fibroblasten mit Zp3-Cre-vermittelter Usp28-Deletion	88

6.2.9	Murine embryonale Fibroblasten mit heterozygotem, konstitutivem Usp28- <i>Knockout</i> weisen einen Proliferationsdefekt und eine veränderte Morphologie auf	92
6.2.10	Der Einfluss der Usp28-Deletion auf die Myc-abhängige Tumorentstehung	94
6.2.10.1	Das E μ -Myc-Lymphom-Modell	94
6.2.10.2	E μ -Myc-Lymphome von Tieren mit heterozygotem Usp28- <i>Knockout</i> zeigen eine Tendenz zu niedrigeren Myc-Proteinleveln	96
6.2.10.3	E μ -Myc-Tiere mit heterozygotem Usp28- <i>Knockout</i> zeigen eine längere tumorfreie Überlebenszeit	100
7	Diskussion	101
7.1	Die Regulation von Fbw7 durch eine PI3K-abhängige Phosphorylierung	101
7.1.1	Posttranslationale Modifikationen, die die Fbw7-Aktivität regulieren	101
7.1.2	Serin 227 in Fbw7 liegt in einer Konsensussequenz für AGC-Kinasen	101
7.1.3	Fbw7 wird PI3K-abhängig an Serin 227 phosphoryliert	102
7.1.4	Die Kinase für die Phosphorylierung von Fbw7 ist nicht Akt	102
7.1.5	Die Phosphorylierung von Serin 227 in Fbw7 beeinflusst sowohl die Stabilität von Fbw7-Substraten, als auch von Fbw7 selbst	103
7.1.6	Die subzelluläre Lokalisation und bekannte Interaktionen von Fbw7 werden nicht von der Phosphorylierung an Serin 227 beeinflusst	105
7.1.7	Die Serin 227-Phosphorylierung hat Einfluss auf die biologische Aktivität von Fbw7	107
7.1.8	Die Bedeutung der Serin 227-Phosphorylierung von Fbw7	108
7.2	Charakterisierung eines konditionalen Usp28- <i>Knockout</i> -Mausmodells	114
7.2.1	Die Bedeutung von Myc in humanen Tumoren	114
7.2.2	Mausmodelle validieren die therapeutische Relevanz der Inhibierung von Myc	115

7.2.3	Usp28 als Protein, das wichtig für die Stabilität von Myc ist	116
7.2.4	Ein konditionales <i>Knockout</i> -Mausmodell für Usp28	118
7.2.5	Effiziente Usp28-Deletion durch verschiedene Cre-Rekombinasen	118
7.2.6	Auswirkungen einer kompletten Usp28-Deletion auf Mäuse und murine embryonale Fibroblasten	119
7.2.7	Der heterozygote Usp28- <i>Knockout</i> zeigt in murinen embryonalen Fibroblasten einen Unterschied zur homozygoten Usp28-Deletion	121
7.2.8	Auch im E μ -Myc-Lymphommodell zeigt die heterozygote Usp28-Deletion Unterschiede im Vergleich zu den homozygoten Genotypen	122
7.2.9	Mögliche Ursachen für den stärkeren Effekt der heterozygoten Usp28-Deletion auf Myc-Proteinmengen und Myc-abhängige Tumorentstehung	124
8	Literaturverzeichnis	130
9	Anhang	144
9.1	Abkürzungsverzeichnis	144
9.2	Publikationen	152
9.3	Lebenslauf	153
9.4	Danksagung	154
9.5	Eidesstattliche Erklärung	155

1 Zusammenfassung

Das Proto-Onkoprotein Myc ist an der Entstehung und Aufrechterhaltung einer Vielzahl humaner Tumore entscheidend beteiligt. Die Erforschung von Signalwegen, die die Stabilität von Myc regulieren, ist deshalb von besonderem Interesse, nicht nur für die Grundlagenforschung, sondern auch zur Erschließung neuer Therapiemöglichkeiten für diese Tumore. Die Myc-Stabilität wird über das Ubiquitin-Proteasom-System reguliert; insbesondere wird Myc von der E3-Ligase SCF-Fbw7 ubiquitiniert und zum Abbau markiert und von der Ubiquitin-spezifischen Protease Usp28 deubiquitiniert und stabilisiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde Serin 227 in Fbw7 als Ziel für eine PI3K-abhängige Phosphorylierung identifiziert. Diese Phosphorylierung führt zur Stabilisierung von Fbw7 und steigert die Fähigkeit von Fbw7, Substratproteine zu ubiquitinieren und abzubauen. Die Mutation der Phosphorylierungsstelle führt zur Destabilisierung von Fbw7 und zum abgeschwächten Abbau von Myc und Zyklin E. Eine Folge dieses verminderten Abbaus von Myc ist die erhöhte Expression einer Gruppe von transkriptionellen Myc-Zielgenen. Somit reguliert die PI3K-vermittelte Phosphorylierung von Serin 227 das Gleichgewicht zwischen dem Abbau von Fbw7 und dessen Substraten und kontrolliert so die Substrataktivität.

Um die Bedeutung von Usp28 in der Myc-induzierten Tumorentstehung und in der normalen Gewebemöostase zu untersuchen, wurde ein konditionales *Knockout*-Mausmodell für Usp28 charakterisiert. Mäuse mit einer Keimbahndeletion von Usp28 sind lebensfähig, fertil und phänotypisch unauffällig. Weder in Organen der Usp28-negativen Tiere, noch in entsprechenden murinen embryonalen Fibroblasten kann eine Destabilisierung von Myc festgestellt werden. Allerdings zeigen Fibroblasten mit heterozygotem Usp28-Verlust einen Proliferationsdefekt und in E μ -Myc-Lymphomen dieses Genotyps werden tendenziell niedrigere Myc-Proteinmengen gefunden. Das tumorfreie Überleben ist bei den E μ -Myc; Usp28 +/- Tieren verlängert. Die erwarteten Effekte eines Usp28-Verlusts sind nur bei Deletion eines Allels festzustellen, ein kompletter Usp28-Verlust ähnelt vielmehr der Wildtyp-Situation.

2 Summary

The proto-oncoprotein Myc is involved in the genesis and maintenance of a large fraction of human tumors. The investigation of signaling pathways regulating Myc's stability is therefore of special interest, not only for basic research but also for finding new strategies for the treatment of these tumors. Myc stability is regulated by the ubiquitin-proteasome system: The E3-Ligase SCF-Fbw7 attaches ubiquitin chains to Myc that serve as a tag for proteasomal destruction. The deubiquitinating enzyme Usp28 is able to remove these ubiquitin chains leading to the stabilization of the Myc protein.

In this work, I identified serine 227 in Fbw7 as a target for PI3K-dependent phosphorylation. The phosphorylation leads to stabilization of Fbw7 and enhances its ability to promote ubiquitination and degradation of its substrates. The mutation of serine 227 destabilizes Fbw7 and attenuates the degradation of Myc and cyclin E. A consequence of the reduced degradation of Myc is the enhanced expression of a subset of Myc's transcriptional targets. Therefore, I suggest that PI3K-dependent phosphorylation of serine 227 is necessary for balancing the degradation of Fbw7 and its substrates, thereby controlling the activity of the substrates.

To investigate the role of Usp28 in Myc-dependent tumorigenesis and in tissue homeostasis I characterized a Usp28 conditional knockout mouse model. Mice with a germline deletion of Usp28 are viable, fertile and phenotypically normal. No decrease in Myc protein levels could be detected in organs or embryonic fibroblasts of Usp28-knockout mice. Surprisingly, embryonic fibroblasts with a heterozygous Usp28 deletion showed a proliferative defect and E μ -Myc lymphomas of this genotype showed a tendency to reduced Myc protein levels, corresponding to a longer tumorfree survival of these animals. Interestingly, only the loss of one allele of Usp28 shows the expected effects in MEFs and tumors whereas the complete Usp28-loss resembles the wildtype situation.

3 Einleitung

3.1 Der onkogene Transkriptionsfaktor Myc

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts gelang es dem Tumorbologen Peyton Rous, einen Tumor von einem Huhn auf ein anderes zu übertragen. Dafür zerkleinerte er das Tumorgewebe und ließ es durch einen sehr feinen Filter fließen, sodass keine Zellen mehr im Filtrat vorhanden waren. Trotzdem führte die Injektion dieses Filtrats in Hühnern zur Ausbildung von Tumoren. Das tumorauslösende Agens musste also sehr klein und unabhängig von Zellen übertragbar sein (Rous, 1911). Ein Virus konnte als das infektiöse Agens identifiziert werden und wurde nach dem Entdecker *Rous Sarkoma Virus* (RSV) genannt. Damit gelang es nachzuweisen, dass auch Viren neben chemischen und physikalischen Stoffen Tumore auslösen können. Somit hatte Rous die Disziplin der Tumorstudiologie begründet. Später konnte das virale Gen identifiziert werden, welches verantwortlich für das transformierende Potential dieses Virus ist (*v-src*). Mit der Zeit wurden immer mehr Tumorstudien und ihre transformierenden Gene identifiziert. Ein solches Gen von enormer Bedeutung stellt *myc* aus dem MC29-Virus dar. Entdeckt wurde es als das Onkogen, das die Vogelerkrankung Myelozytomatose (englisch *myelocytomatosis*) auslöst (Sheiness et al., 1978; Vennstrom et al., 1982). Heute weiß man, dass es eine große Bedeutung in Tumoren des Menschen hat. Als die genetische Sequenz der viralen Onkogene auch in der DNA nicht-infizierter Zellen gefunden wurde, entstand das Konzept, dass virale Onkogene (z. B. *v-myc*) aus zellulären Proto-Onkogenen (z. B. *c-MYC*) entstanden sind (Hann et al., 1983; Swanstrom et al., 1983), was die molekulare Tumorstudien revolutioniert und zur Identifizierung zahlreicher zellulärer Onkogene geführt hat.

Seit seiner Entdeckung vor mehr als einem Vierteljahrhundert wurde die Regulation und Funktion des Proto-Onkogens *MYC* intensiv erforscht und die zahlreichen Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen hatten Einfluss auf unser grundsätzliches Verständnis von den molekularen Grundlagen der Tumorentstehung (zusammengefasst in (Meyer and Penn, 2008)).

3.2 Die Familie der Myc-Proteine

Zur Familie der humanen, transformierenden Myc-Proteine gehören c-Myc, N-Myc und L-Myc. *MYCN*, das Gen, das für N-Myc codiert und wichtig in der Embryonalentwicklung ist, wurde in humanen Neuroblastomen in amplifizierter Form gefunden und mit einer schlechten Patientenprognose in Verbindung gebracht (Brodeur et al., 1984; Schwab et al., 1984). Auch *MYCL1*, das für L-Myc kodierende Gen, das ebenfalls hauptsächlich während der Entwicklung exprimiert wird, liegt in kleinzelligen Bronchialkarzinomen amplifiziert vor (Nau et al., 1985). Myc-Proteine sind evolutionär hoch konserviert und wurden z. B. auch in der Taufliege *Drosophila melanogaster* beschrieben (Gallant et al., 1996). In den folgenden Abschnitten wird die Funktion und Regulation von c-Myc (nachfolgend als Myc bezeichnet) erläutert, dem bisher am besten charakterisierten Mitglied der Myc-Familie.

3.3 Der Aufbau des c-Myc-Proteins

Das humane Myc-Protein enthält im amino-terminalen Bereich die sogenannte Transaktivierungsdomäne mit den Myc-Boxen I und II. Der Name Transaktivierungsdomäne ist jedoch nicht ganz zutreffend, da auch die Genrepression und transkriptionsunabhängige Funktionen von Myc über diesen Bereich reguliert werden (Cowling and Cole, 2007). Der amino-terminale Bereich von Myc interagiert mit verschiedenen Kofaktoren und reguliert so Proliferation, Transformation, Apoptose und Differenzierung. Myc-Boxen sind konservierte Regionen, die wichtige Rollen in der Myc-Biologie spielen. Myc-Box I ist notwendig für die Transformation von primären embryonalen Rattenfibroblasten durch Myc und Ras (Stone et al., 1987). Außerdem spielt Myc-Box I eine wichtige Rolle für die Stabilität von Myc, da die Phosphorylierung von Threonin 58 und Serin 62 den proteasomalen Abbau von Myc reguliert (Sears et al., 2000). Myc-Box II dient als Bindestelle für eine Reihe von Interaktionspartnern, z. B. TRRAP (*transactivation/transformation-associated protein*) (McMahon et al., 1998), TIP48/49 (*TBP interacting protein*) (Wood et al., 2000) und Skp2 (*S-phase kinase-associated protein 2*) (Kim et al., 2003; von der Lehr et al., 2003) und ist dadurch sowohl notwendig für die Transformation als auch für die transkriptionelle Aktivierung und Repression durch Myc. Myc-Box III ist wichtig für die transkriptionelle Repression und Transformation durch Myc und ist ein negativer Regulator der Myc-induzierten Apoptose (Herbst et al., 2005). Myc-Box IV reguliert Apoptose, Transformation und DNA-Bindung (Cowling et

al., 2006). Das nukleäre Lokalisierungssignal ist für die subzelluläre Lokalisation von Myc im Zellkern verantwortlich (Dang and Lee, 1988). Über die carboxy-terminal gelegene Helix-Loop-Helix/Leuzin-Zipper-Domäne dimerisiert Myc mit seinem Partnerprotein Max (*Myc-associated factor X*), das ebenfalls eine solche Domäne besitzt. Die basische Region vermittelt die sequenzspezifische DNA-Bindung der Myc-Max-Dimere (Blackwood and Eisenman, 1991). Der carboxy-terminale Bereich ist auch für die Interaktion mit weiteren Kofaktoren, wie p300 und Miz1 (*Myc-interacting zinc finger protein 1*) notwendig (Peukert et al., 1997; Vervoorts et al., 2003).

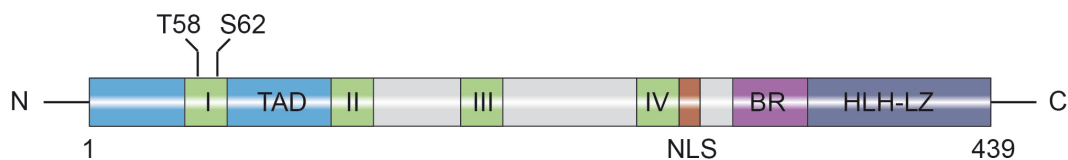


Abb. 1: Aufbau des humanen c-Myc Proteins

Schematische Darstellung des humanen c-Myc Proteins mit wichtigen funktionellen Domänen. TAD: Transaktivierungsdomäne; grün: Myc-Box I-IV; NLS: Nukleäres Lokalisierungssignal; BR: Basische Region; HLH-LZ: Helix-Loop-Helix-Leuzin-Zipper. Gezeigt ist die bevorzugt exprimierte Form von Myc, p64, mit 439 Aminosäuren (angelehnt an (Meyer and Penn, 2008)).

3.4 Funktionen von c-Myc

Die Aktivierung von Myc resultiert in globalen Änderungen der Genexpression, sowohl durch Hochregulation, als auch durch Repression von Genen. Myc kontrolliert dabei wichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation, Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose.

Exemplarisch wird hier die Funktion von Myc bei der Zellzyklusprogression und Proliferation dargestellt. Heterodimere aus Myc und Max können im Zellkern an spezifische DNA-Sequenzen, sogenannte E-Boxen binden (Blackwell et al., 1990). Die an E-Boxen gebundenen Myc-Max-Heterodimere wirken als transkriptionelle Aktivatoren, z. B. von Genen, die notwendig für die Zellzyklusprogression sind, wie *CCND2* (Zyclin D2) (Bouchard et al., 1999) oder *Cdk4* (Hermeking et al., 2000). Der Komplex aus Zyclin D2 und *Cdk4* fördert die Progression durch die frühe G1-Phase durch Phosphorylierung und Inaktivierung des Rb-Proteins. In der späten G1-Phase aktivieren

die Myc-Max-Dimere die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie. Die E2F-Zielgene codieren vor allem für Proteine, die in der beginnenden S-Phase benötigt werden.

Myc fördert die Zellzyklusprogression nicht nur durch die transkriptionelle Aktivierung von positiven Zellzyklus-Regulatoren, sondern auch durch die Repression von negativen Zellzyklus-Regulatoren, wie z. B. *CDKN2B* (p15^{Ink4B}), *CDKN1A* (p21^{Cip1}) und *CDKN1B* (p27^{Kip1}). Diese Gene werden vom Transkriptionsfaktor Miz1 über die Bindung an deren *Core*-Promotoren aktiviert. Durch Bindung des Myc-Max-Komplexes an Miz1 wird die Expression dieser Cdk-Inhibitoren reprimiert (Herold et al., 2002; Seoane et al., 2002; Staller et al., 2001). Somit nimmt Myc Einfluss auf die Expressionslevel einer Vielzahl von Zellzyklus-Regulatoren mit dem Resultat, dass die Zellen durch die G1-Phase in die S-Phase übertreten, um Proliferation und Zellwachstum zu ermöglichen.

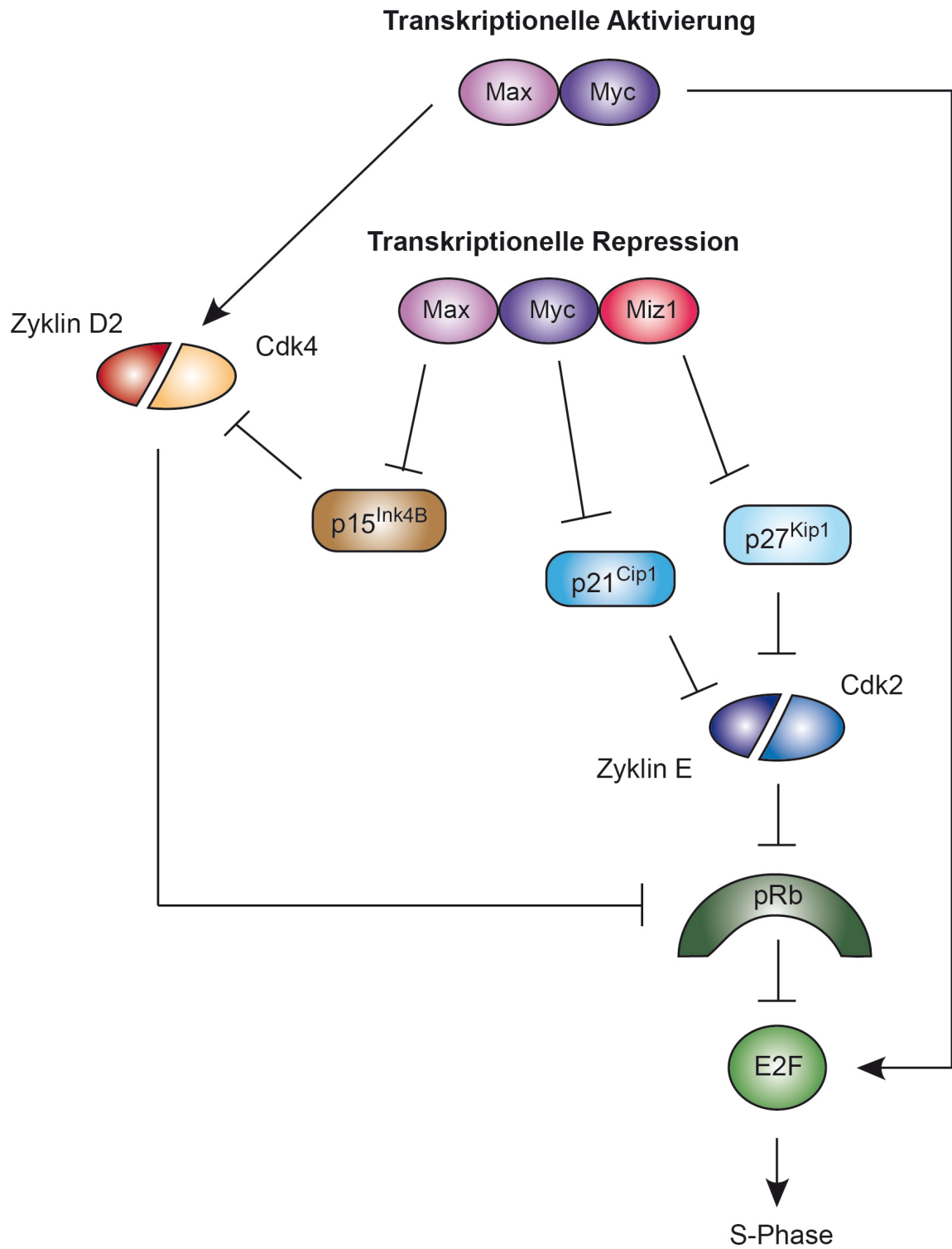


Abb. 2: Myc fördert die Proliferation durch Aktivierung und Repression von Zellzyklusregulatoren
Heterodimere aus Myc und Max aktivieren die Transkription von positiven Zellzyklusregulatoren wie Zyklin D2 und Cdk4, die das Durchschreiten der frühen G1-Phase fördern. Durch Aktivierung von E2F treibt Myc den Eintritt in die S-Phase an. Über die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Miz1 können die Myc/Max-Dimere auch als transkriptionelle Repressoren wirken und die Cdk-Inhibitoren p15^{Ink4B}, p21^{Cip1} und p27^{Kip1} hemmen, was die Zellzyklusprogression weiter fördert (angelehnt an (Weinberg, 2007)).

3.5 Die Regulation von c-Myc

Neuere Methoden wie die Hochdurchsatz-Sequenzierung von DNA aus Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP-seq) zeigten, dass 10 bis 15 % aller genomischen Loci von Myc gebunden werden (Zeller et al., 2006). Da Myc Proliferation, Differenzierung, Zelladhäsion, Angiogenese, Metabolismus und genomische Stabilität beeinflusst (Adhikary and Eilers, 2005), hat eine Deregulation von Myc fatale Konsequenzen. Tatsächlich ist die Myc-Expression in sehr vielen humanen Tumoren dereguliert. Dadurch wird deutlich, wie wichtig die präzise Regulation der Myc-Expression ist, um die normale Zellfunktion aufrechtzuerhalten. Deshalb erfolgt die Regulation von Myc auf allen möglichen zellulären Ebenen: transkriptionell (Initiation und Elongation), posttranskriptionell (mRNA-Stabilität und Translation) und posttranslational (Proteinstabilität). Außerdem wird die Aktivität des Myc-Proteins durch posttranslationale Modifikationen und Protein-Interaktionen reguliert.

3.5.1 Transkriptionelle Regulation von c-Myc

Die Regulation des *MYC*-Promotors ist sehr komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. Die genomische *MYC*-Sequenz ist aus drei Exons aufgebaut, wobei nur Exons 2 und 3 kodierend und hoch konserviert sind (Marcu et al., 1992). Das humane *MYC*-Gen besitzt zwar vier Promotoren (P0, P1, P2, P3), jedoch werden in normalen Zellen 75 bis 90 % der *MYC*-mRNA-Transkripte vom Promotor P2 aus hergestellt und 10 bis 25 % vom Promotor P1. Die resultierenden Proteine sind 439 bzw. 453 Aminosäuren lang und werden als p64 bzw. p67 bezeichnet (zusammengefasst in (Wierstra and Alves, 2008)).

In ruhenden Zellen ist die Expression von Myc kaum nachweisbar. Werden die Zellen allerdings mit Wachstumsfaktoren stimuliert, so kommt es zu einer schnellen Induktion der *MYC*-mRNA, während die Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten (G0/G1-Übergang). Maximale mRNA-Mengen werden abhängig vom Zelltyp ungefähr zwei Stunden nach Stimulation erreicht. Dies findet auch in Anwesenheit des Translationsinhibitors Cycloheximid statt, also ohne Proteinneusynthese. Somit gehört *MYC* zu den sogenannten *immediate early response genes* (Kelly et al., 1983; Marcu et al., 1992). In proliferierenden Zellen wird die *MYC*-mRNA auf konstant niedrigem Niveau exprimiert (Thompson et al., 1985). Bei einem Wachstumsarrest oder bei der Differenzierung verringert sich die Myc-Expression (Spencer and Groudine, 1991). In terminal differenzierten Zellen wird Myc

nicht mehr exprimiert. Daher beschränkt sich die Myc-Expression in adulten Organismen auf Gewebe mit proliferativem und regenerativem Potential (zusammengefasst in (Wierstra and Alves, 2008)).

Myc war das erste eukaryotische Gen, bei dem die Regulation durch einen Transkriptions-Elongations-Block entdeckt wurde. Dabei stoppen die RNA-Polymerase II-Komplexe im Bereich des Übergangs von Exon 1 zu Intron 1. Dieser Vorgang dient vermutlich der Herunterregulation von Myc während der Differenzierung und kann in Tumoren defekt sein (Bentley and Groudine, 1986; Bentley and Groudine, 1988; Eick and Bornkamm, 1986).

Eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren kann an den *MYC*-Promotor binden (zusammengefasst in (Wierstra and Alves, 2008)). So wird die Expression von *MYC* z. B. durch E2F-Transkriptionsfaktoren induziert, was unter anderem in Reaktion auf Onkoproteine wie das adenovirale E1A oder das *large T*-Antigen von SV40 passiert (Hiebert et al., 1989; Thalmeier et al., 1989). Da die Transkription von E2F wiederum von Myc gefördert werden kann (Abschnitt 3.4), arbeiten Myc und E2F in einem positiven *Feedback-Loop* zusammen, um den Eintritt von Zellen in die S-Phase zu fördern. Auch der Wnt-Signalweg kann *MYC* über den Transkriptionsfaktor Tcf-4 (*T-cell factor 4*) induzieren (He et al., 1998). Eine Hemmung der *MYC*-Transkription dagegen kann z. B. durch den TGF β -Signalweg auftreten (Fernandez-Pol et al., 1987).

Darüber hinaus reguliert Myc seine eigene Expression durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus. Eine hohe Konzentration an Myc-Protein hemmt in normalen Zellen reversibel und dosisabhängig die Myc-Expression auf Ebene der Transkriptionsinitiation (Penn et al., 1990). Dieser Mechanismus wurde durch die Beobachtung entdeckt, dass in Tumoren mit einem chromosomal translozierten, konstitutiv exprimierten Myc-Allel (z. B. im Burkitt-Lymphom) die Expression des normalen Myc-Allels unterdrückt wird (Adams et al., 1983; Dunnick et al., 1983; Leder et al., 1983). Das translozierte Allel ist der negativen Autoregulation dabei nicht zugänglich. Dieser negative Rückkopplungsmechanismus ist in primären Zellen und in einigen etablierten, immortalen Zelllinien aktiv, in transformierten Zellen hingegen nicht. Das deutet darauf hin, dass es für die maligne Tumorentwicklung notwendig ist, diesen Mechanismus zu umgehen (Grignani et al., 1990; Lombardi et al., 1990).

3.5.2 Post-transkriptionelle Regulation von c-Myc

3.5.2.1 mRNA-Stabilität

Die enormen Unterschiede der *MYC*-mRNA-Expression nach proliferativen oder antiproliferativen Stimuli ließen sich durch die Regulation der Transkription allein nicht erklären. Daher wurde auch die *MYC*-mRNA-Stabilität intensiv untersucht. Die *MYC*-mRNA hat im Vergleich zur Mehrzahl der eukaryotischen mRNAs eine ungewöhnlich kurze zytoplasmatische Halbwertszeit von nur 20 bis 30 Minuten (Dani et al., 1984). Ein Mechanismus, über den die zytoplasmatische Stabilität der *MYC*-mRNA reguliert wird, ist die Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes, welche von AU-reichen Sequenzen im untranslatierten Bereich am 3'-Ende der *MYC*-mRNA (3'UTR von *untranslated region*) reguliert wird. Nach der Dissoziation der Poly(A)-Bindeproteine wird der Poly(A)-Schwanz zuerst verkürzt und dann abgespalten, was die mRNA destabilisiert und zu ihrem enzymatischen Abbau führt (Brewer and Ross, 1988; Jones and Cole, 1987). Ein Mechanismus, der zur Stabilisierung der *MYC*-mRNA beiträgt, ist die Bindung des Proteins CRD-BP (*coding region determinant-binding protein*) im carboxy-terminalen Bereich der mRNA, was deren enzymatischen Abbau verhindert (Bernstein et al., 1992). Eine Amplifikation dieses Proteins wurde in verschiedenen Tumoren gefunden und stellt eine Möglichkeit der Hochregulierung von Myc in Tumoren dar (Doyle et al., 2000; Ioannidis et al., 2001; Noubissi et al., 2006).

3.5.3 Translation

Auch auf der Ebene der Translation der *MYC*-mRNA gibt es eine Reihe von Regulationsmechanismen. In der 5'-UTR befindet sich eine IRES-Sequenz (*internal ribosome entry site*), die die *MYC*-Translation erhöht. Auch über die 5'-Kappe wird die *MYC*-Translation reguliert (Carter et al., 1999). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass verschiedene microRNAs (miRNAs) mit der 3'UTR der *MYC*-mRNA interagieren können, was die Translation blockieren oder zum Abbau der mRNA führen kann (Cannell et al., 2010; Kress et al., 2011; Sachdeva et al., 2009; Sampson et al., 2007). Die microRNAs mir-34b und c sind Teil eines negativen Rückkopplungsmechanismus für Myc, der in kolorektalen Karzinomen außer Kraft gesetzt sein kann. Dabei aktiviert Myc direkt die Transkription der Kinase MK5, die dann den Transkriptionsfaktor FoxO3a

phosphorylieren und aktivieren kann. Foxo3a wiederum aktiviert die Transkription von miR-34b/c, die dann über die Interaktion mit der 3'UTR der *MYC*-mRNA die Translation und somit die Proteinexpression von Myc hemmen können (Kress et al., 2011).

3.5.4 Proteinstabilität

Ebenso wie die *MYC*-mRNA hat auch das Myc-Protein eine kurze Halbwertszeit von nur 20 bis 30 Minuten (Hann and Eisenman, 1984). Die Myc-Proteinstabilität wird über posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Ubiquitinierung reguliert (Hann, 2006; Vervoorts et al., 2006). Die am besten untersuchten Phosphorylierungsstellen sind Threonin 58 und Serin 62 in der Myc-Box I (Henriksson et al., 1993). Die Phosphorylierung von Serin 62 durch MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinasen (auch ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) genannt) stabilisiert Myc und ist die Voraussetzung für die Phosphorylierung von Threonin 58 durch GSK3 β (Glykogen Synthase Kinase 3 β) (Lutterbach and Hann, 1994; Sears et al., 1999; Sears et al., 2000). Die Phosphorylierung von Threonin 58 wiederum destabilisiert Myc und erleichtert die Dephosphorylierung von Serin 62. Die beiden Phosphorylierungen sind also gegenseitig abhängig und werden von Ras-induzierten Signalwegen reguliert: Serin 62 durch die Ras/Raf/MEK/ERK-Kinase-Kaskade und Threonin 58 durch den PI3K/Akt-Signalweg, der GSK3 β negativ reguliert. Phosphoryliertes Threonin 58 wird von der Prolyl-Isomerase PIN1 erkannt, die Prolin 63 von Myc isomerisiert. Dadurch wird Serin 62 für die Protein-Phosphatase 2A (PP2A) zugänglich und kann dephosphoryliert werden (Yeh et al., 2004). Das Myc-Protein, das dann nur an Threonin 58 phosphoryliert ist, kann von der Ubiquitin-Ligase SCF-Fbw7 erkannt und ubiquitiniert werden, was als Marker für den proteasomalen Abbau dient (Welcker et al., 2004a; Welcker et al., 2004b; Yada et al., 2004). Es konnte gezeigt werden, dass Axin1 die Ausbildung eines Abbaukomplexes für Myc fördert, indem es als Gerüst für Serin 62-phosphoryliertes Myc, GSK3 β , PIN1 und PP2A dient (Arnold et al., 2009; Schüle and Eilers, 2009).

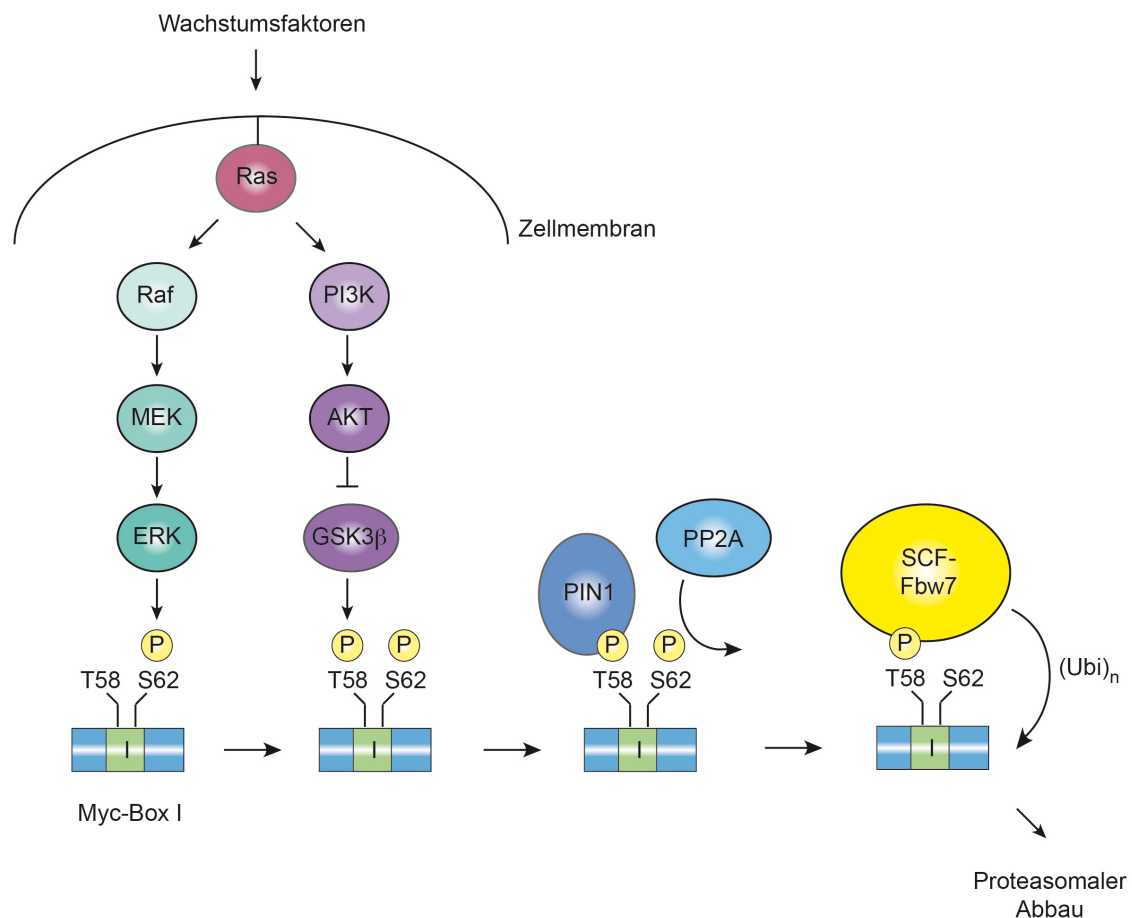


Abb. 3: Regulation der Myc-Proteinstabilität durch SCF-Fbw7

Die Phosphorylierung von Ser 62 in Myc-Box I durch ERK ist notwendig, damit Thr 58 durch GSK3 β phosphoryliert werden kann. Beide Kinasen werden durch Ras reguliert; somit ist die Myc-Stabilität an wachstumsfaktorabhängige Signale gekoppelt. PIN1 kann an phosphoryliertes Thr 58 binden und Pro 63 isomerisieren, was Voraussetzung für die PP2A-abhängige Dephosphorylierung von Ser 62 ist. Myc-Protein, das nur an Thr 58 phosphoryliert ist, wird von SCF-Fbw7 ubiquitiniert und so für den proteasomalen Abbau markiert (angelehnt an (Adhikary and Eilers, 2005)).

In Burkitt-Lymphomen, in denen eine chromosomale Translokation zur onkogenen Aktivierung von Myc führt, werden manchmal zusätzliche, sekundäre Mutationen im translozierten Myc-Allel gefunden, die dem Tumor einen selektiven Vorteil bringen. Einer der Mutations-*Hotspots* ist Threonin 58. Die Folge dieser Punktmutation ist eine reduzierte Ubiquitinierung und ein verminderter proteasomaler Abbau von Myc; außerdem hat eine solche Punktmutante auch eine erhöhte onkogene Aktivität, da sie keine Apoptose mehr auslösen kann (Bahram et al., 2000; Gregory and Hann, 2000; Hemann et al., 2005; Salghetti et al., 1999).

Neben SCF-Fbw7 gibt es noch eine Reihe weiterer Ubiquitin-Ligasen, die Myc ubiquitinieren und damit entweder die Aktivität oder die Stabilität beeinflussen.

SCF- β -TrCP katalysiert die Anheftung von heterotypischen Ubiquitinketten an den Amino-Terminus von Myc, was den SCF-Fbw7-vermittelten Abbau antagonisiert und somit Myc stabilisiert (Popov et al., 2010). SCF-Skp2 ubiquitiniert Myc vermutlich phosphorylierungsunabhängig, was zuerst die transkriptionelle Aktivität von Myc fördert, anschließend allerdings auch zum proteasomalen Abbau führt (Kim et al., 2003; von der Lehr et al., 2003). Für die Ubiquitin-Ligase HectH9 wurde beschrieben, dass sie Lysin 63-verknüpfte Polyubiquitinketten an das c-Myc-Protein heftet, was nicht zum Abbau führt, sondern vielmehr die Rekrutierung von Kofaktoren und somit die transkriptionelle Aktivität fördert (Adhikary et al., 2005). N-Myc hingegen kann während der Differenzierung von HectH9 durch die Anheftung von Lysin 48-verknüpften Ubiquitinketten zum Abbau markiert werden (Zhao et al., 2008). Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch die E3-Ligase TRUSS sowohl N-Myc, als auch c-Myc ubiquitinieren kann, was zum proteasomalen Abbau führt (Choi et al., 2010).

3.6 Proteinabbau

Für die Aufrechterhaltung der zellulären Prozesse ist die richtige Balance verschiedener Proteine entscheidend. Ein wichtiger Mechanismus, über den die Menge und Aktivität von Proteinen kontrolliert wird, ist der Proteinabbau. Dabei erfolgt der Abbau der Proteine nicht wahllos, sondern über ein streng kontrolliertes System, das Ubiquitin-Proteasom-System. Für die Entdeckung des Ubiquitin-vermittelten Abbaus von Proteinen wurde den Forschern Aaron Ciechanover, Avram Hershko und Irwin Rose 2004 der Nobelpreis für Chemie verliehen.

3.6.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Proteine, die für den Abbau vorgesehen sind, werden kovalent mit Ubiquitin verknüpft, was als Erkennungssignal für einen großen proteolytischen Komplex, das Proteasom, dient. Darüberhinaus werden über die kovalente Verknüpfung von Proteinen mit Ubiquitin oder ubiquitinähnlichen Proteinen (wie SUMO oder NEDD8) auch viele weitere zelluläre Prozesse reguliert, wie Zellzyklusprogression, Signaltransduktion, Transport über die Zellmembran, Proteinqualitätskontrolle im Endoplasmatischen Retikulum oder Transkription (zusammengefasst in (Amerik and Hochstrasser, 2004)).

Ubiquitin ist ein kleines, aus nur 76 Aminosäuren bestehendes, globuläres Protein, das seinen Namen der Tatsache verdankt, dass es ubiquitär in eukaryotischen Zellen vorkommt. Es ist evolutionär hochkonserviert (das Ubiquitin des Menschen unterscheidet sich von dem der Hefe nur durch drei Aminosäuren), was ein Anzeichen für seine essentielle Funktion ist.

Der Markierungsprozess von Proteinen mit Ubiquitin (Ubiquitinierung) wird von einer Kaskade aus drei Enzymen katalysiert, die nach ihrer Reaktionsreihenfolge E1, E2 und E3 genannt werden (Übersichtsartikel: (Hershko and Ciechanover, 1998)). Im ersten Schritt dieser Kaskade wird das Ubiquitin in einer ATP-abhängigen Reaktion durch das Ubiquitinaktivierende Enzym (E1 oder UBA) aktiviert, indem die Carboxylgruppe (-COOH) des carboxy-terminalen Glycin 76 von Ubiquitin eine Thioesterbindung mit der Thiolgruppe (-SH) eines Cysteins von E1 eingeht (Schulman and Harper, 2009). Das aktivierte Ubiquitin wird dann in einer Transacylierungsreaktion auf die Thiolgruppe eines Cysteins des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2 oder UBC) übertragen (Ye and Rape, 2009). Schließlich wird das Ubiquitin mit Hilfe einer E3-Ubiquitin-Ligase auf das Substratprotein übertragen. Dabei entsteht eine Isopeptidbindung zwischen der Carboxylgruppe des Glycin 76 von Ubiquitin und der ϵ -Aminogruppe eines internen Lysins des Substratproteins (Deshaies and Joazeiro, 2009). Inzwischen ist allerdings auch bekannt, dass ebenso die α -Aminogruppe der endständigen Aminosäure am Amino-Terminus ubiquitiniert werden kann, z. B. beim Myc-Protein durch SCF- β -TrCP und SCF-Fbw7 (Ciechanover and Ben-Saadon, 2004; Popov et al., 2010). Nach der Verknüpfung der ersten Ubiquitin-Einheit kann eine Polyubiquitinkette gebildet werden, bei der jeweils der Carboxy-Terminus des nächsten Ubiquitins mit einem Lysin des vorherigen Ubiquitins verknüpft wird. Dabei kann das E2-Enzym die Art der Verknüpfung bestimmen. Ubiquitinketten, die über Lysin 48 verknüpft sind und mindestens aus vier Ubiquitinmolekülen bestehen, werden vom Proteasom als Abbausignal erkannt. Es wurde allerdings auch beschrieben, dass Ubiquitinketten mit anderen Verknüpfungen als Abbausignale wirken können und dass Lysin 48-verknüpfte Ketten nicht zwangsläufig zum proteasomalen Abbau führen müssen (Flick et al., 2004; Kirkpatrick et al., 2006). Im 26S-Proteasom wird das Substratprotein in kleine Peptide zerlegt, das Ubiquitin hingegen wird recycelt. Darüberhinaus sind noch zahlreiche weitere Arten der Ubiquitinierung bekannt, die nicht als Abbausignale dienen, sondern z. B. die transkriptionelle Aktivität

beeinflussen. Je nach Anzahl der verbundenen Ubiquitine unterscheidet man die Mono-, Oligo-, Multi- und Polyubiquitinierung. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Ubiquitinketten über alle sieben Lysine (6, 11, 27, 29, 33, 48 und 63) von Ubiquitin verknüpft werden können, wobei die Art der Verknüpfung oft die Funktion der Ubiquitinkette am Substratprotein bestimmt. Auch gemischte Ketten wurden beschrieben (Xu et al., 2009). Die Funktion dieser verschiedenen Arten der Ubiquitinierung ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.

Die Ubiquitinierung ist ein reversibler Prozess und kann durch deubiquitinierende Enzyme (*deubiquitinating enzymes*, DUBs) rückgängig gemacht werden (Nijman et al., 2005) (siehe Abschnitt 3.6.3).

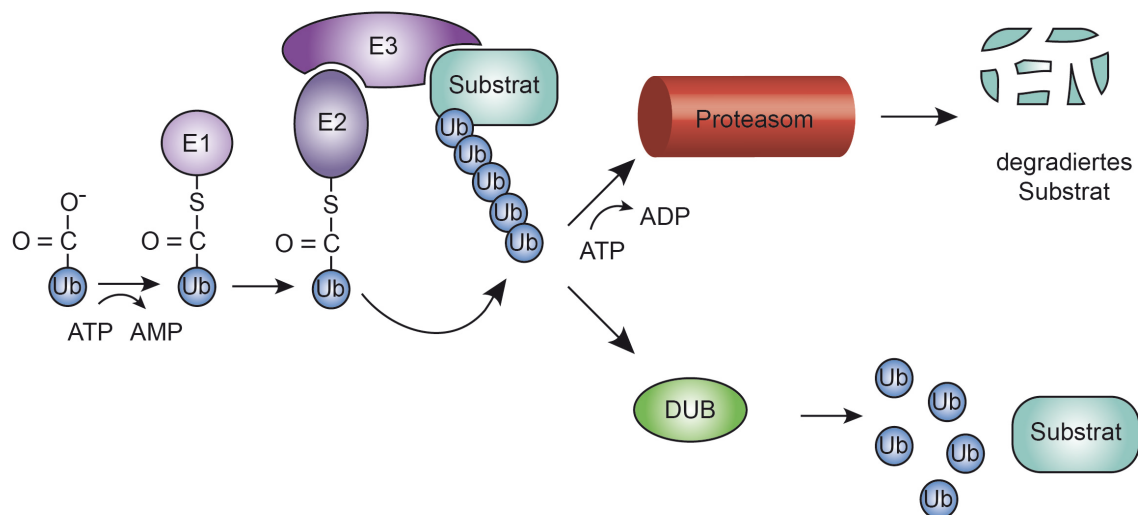


Abb. 4: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Signalweges

Ubiquitin wird in einer ATP-abhängigen Reaktion durch ein E1-Enzym aktiviert und dann auf ein E2-Enzym übertragen. Eine Ubiquitin-Protein-Ligase (E3) verknüpft das Ubiquitin kovalent mit dem Substratprotein. Nach Ausbildung einer Lys 48-verknüpften Polyubiquitinkette wird das Substrat im 26S-Proteasom abgebaut. Ubiquitinierungsreaktionen sind reversibel und können durch deubiquitinierende Enzyme (DUBs) rückgängig gemacht werden, was zur Stabilisierung des Substrats führt (angelehnt an (Hoeller et al., 2006)).

Während die E2-Enzyme Einfluss auf die Art der Ubiquitin-Verknüpfung haben (Wickliffe et al., 2011), sorgen die E3-Ubiquitin-Ligasen für die Substratspezifität, indem sie spezifische Erkennungsmotive der Substratproteine binden. In einigen Fällen ist ein zusätzliches E4-Enzym (*ubiquitin-chain elongation factor*) notwendig, um eine aus wenigen Ubiquitinmolekülen bestehende Kette zu verlängern (Koegl et al., 1999). Alle bisher identifizierten E3-Ligasen besitzen entweder eine HECT (*homologous to E6-AP*

carboxy terminus)-Domäne oder ein RING (*really interesting new gene*)-Finger-Motiv (zusammengefasst in (Pickart, 2001)). Während HECT-E3-Ligasen direkt Thioesterbindungen mit Ubiquitin ausbilden und dieses anschließend auf das Substratprotein übertragen (Schwarz et al., 1998), vermitteln RING-E3-Ligasen nur die Bindung zwischen E2-Enzym und dem Substratprotein, sind aber selbst nicht direkt an der Ubiquitinierungsreaktion beteiligt (Jackson et al., 2000; Joazeiro and Weissman, 2000). Zur Familie der RING-Finger E3-Ligasen gehört der SCF-Komplex (SKP1-CUL1-F-Box-Protein) (Nakayama and Nakayama, 2005). Der SCF-Komplex besteht aus drei invariablen Komponenten, dem Adapterprotein SKP1, dem Gerüstprotein CUL1 und dem RING-Finger-Protein RBX1, und einer variablen Komponente, dem F-Box-Protein, das für die Substratbindung verantwortlich ist.

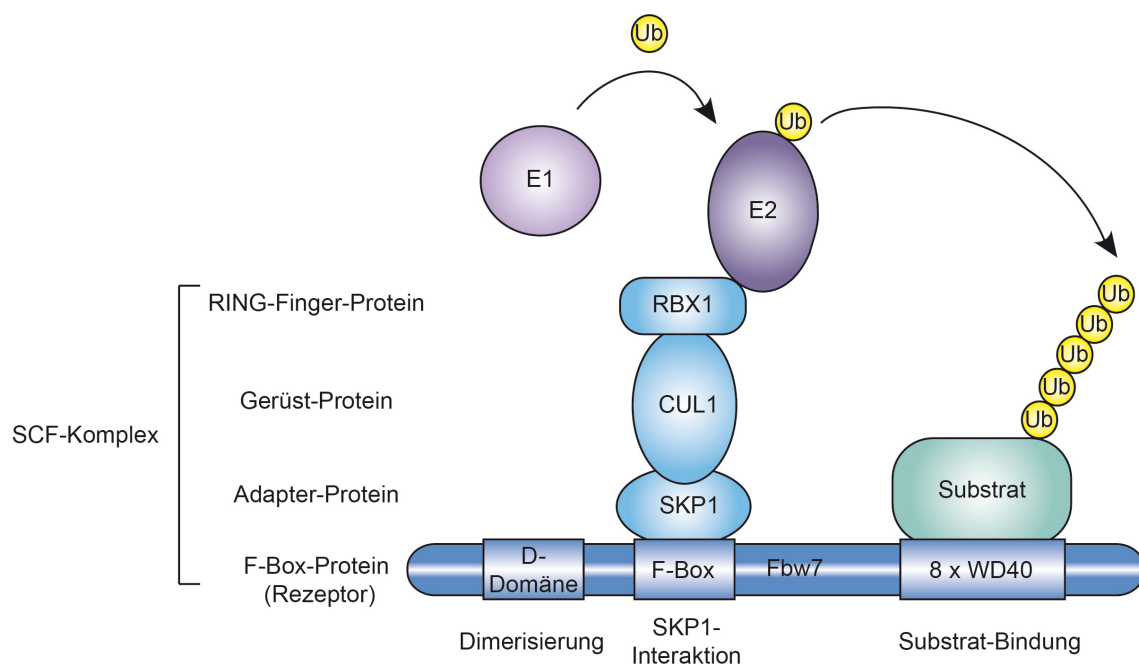


Abb. 5: Schematische Darstellung des SCF-Fbw7-Komplexes

Der SCF-Komplex besteht aus einem F-Box-Protein als Rezeptor für Substratproteine, SKP1 als Adapter, CUL1 als Gerüst und RBX1 als RING-Finger-Protein, das mit dem E2-Enzym interagiert. Bei Fbw7 handelt es sich um ein F-Box-Protein mit acht WD40 *repeats* für die Bindung phosphorylierter Substrate, einer D-Domäne für die Dimerisierung und einer F-Box für die Interaktion mit SKP1 (angelehnt an (Welcker and Clurman, 2008)).

3.6.2 Fbw7

Fbw7 (*F-box and WD40 repeat domain-containing 7*, Fbxw7, CDC4 in Hefe, AGO in *Drosophila*, SEL10 in Nematoden) ist ein F-Box-Protein und für den phosphorylierungsabhängigen Abbau von Myc verantwortlich (Welcker et al., 2004b; Yada et al., 2004). Weitere Substrate von Fbw7 sind unter anderem Zyklin E, Notch, Jun, SREBP1, mTOR, und McI1 (Inuzuka et al., 2011; Koepp et al., 2001; Mao et al., 2008; Nateri et al., 2004; Oberg et al., 2001; Strohmaier et al., 2001; Sundqvist et al., 2005). Da es sich bei Myc, Zyklin E und Jun um Proto-Onkogene handelt, wirkt Fbw7 als Tumorsuppressor.

Das humane Fbw7 liegt in 3 Isoformen vor (alpha, beta und gamma), die durch alternatives Spleißen entstehen. Jede mRNA besteht aus einem isoformspezifischen ersten Exon und zehn weiteren Exons, die in allen drei Isoformen gleich sind. Somit unterscheiden sich die Proteine nur in ihrem amino-terminalen Teil, der die subzelluläre Lokalisation bestimmt: Fbw7 α befindet sich im Zellkern, Fbw7 β im Zytoplasma und Fbw7 γ im Nucleolus (Übersichtsartikel: (Welcker and Clurman, 2008)). Proliferierende Zellen exprimieren alle drei Isoformen. In adulten Geweben wird die alpha-Isoform ubiquitär exprimiert, während die beta- und gamma-Isoformen eher gewebespezifisch vorliegen. Fbw7 α ist die am stärksten exprimierte Isoform und da die meisten beschriebenen Substrate ebenfalls im Zellkern lokalisiert sind, ist Fbw7 α allein ausreichend für den Abbau dieser Substrate (Grim et al., 2008; van Drogen et al., 2006). Fbw7 besitzt mehrere konservierte Protein-Protein-Interaktions-Domänen. Über die F-Box interagiert Fbw7 mit SKP1 (*S-phase kinase-associated protein 1*) und rekrutiert so den gesamten SCF-Komplex. Die Dimerisierungsdomäne vermittelt die Interaktion zweier Moleküle von Fbw7. Es wird angenommen, dass die Dimerisierung die Ubiquitinierung verstärkt, indem es die Affinität des F-Box-Proteins zu Substraten mit schwachen Abbausignalen erhöht. Monomeres Fbw7 reicht jedoch für einen effizienten Abbau von Myc und Zyklin E aus (Welcker and Clurman, 2007). Fbw7 rekrutiert als E2-Enzym Cdc34 und verknüpft Ubiquitin bevorzugt über Lysin 48, was als degradierendes Signal gilt (Popov et al., 2010). Im Carboxy-Terminus befinden sich acht WD40 *repeats*, die im Protein eine fassförmige Struktur formen, welche für die Substratbindung verantwortlich ist. Dabei erfolgt die Substraterkennung über konservierte Phospho-Epitope der Substratproteine, die sogenannten CPDs (Cdc4-Phospho-Degron). Diese CPDs enthalten meist ein zentrales

Phospho-Threonin (z. B. Threonin 58 in Myc). Wie auch Myc werden die meisten Fbw7-Substrate an ihren CPDs durch GSK3 β , einer mitogenen Kinase, phosphoryliert. Somit koppeln die CPDs die Fbw7-Aktivität an mitogene Signale. Wie schon für Myc beschrieben (Abschnitt 3.5.4), liegen Mutationen der CPDs oft in Tumoren vor und führen zur Stabilisierung der jeweiligen Onko-Proteine. Fbw7 selbst ist in 6 % aller Tumore mutiert (Akhoondi et al., 2007). Da Fbw7 für den Abbau von vielen wichtigen Onko-Proteinen verantwortlich ist, hat eine einzelne Mutation in Fbw7 weitreichende Konsequenzen. Vor allem Punktmutationen werden häufig gefunden, z. B. sind die konservierten Arginine innerhalb der WD40 *repeats*, über die der Kontakt mit den phosphorylierten Substraten erfolgt, besonders häufig betroffen. Es treten aber auch Mutationen auf, die zu einem frühzeitigen Kettenabbruch bei der Translation und somit zu einem verkürzten Protein führen. Dadurch kann die Substrat-Interaktion verhindert werden. Ein Kettenabbruch nach der D-Domäne oder eine Punktmutation in den WD40 *repeats* wirkt dominant-negativ, das heißt, diese Formen von Fbw7 können zwar keine Substrate mehr binden, sind aber immer noch in der Lage mit Wildtyp-Fbw7 zu dimerisieren und mit dem SCF-Komplex zu interagieren (zusammengefasst in (Welcker and Clurman, 2008)). Ein kompletter Verlust von Fbw7 führt, vermutlich durch die Akkumulation von Zyklin E, zu chromosomaler Instabilität und Tumorentstehung. Fbw7-defiziente Mäuse sterben *in utero* ungefähr am Tag 11 der Embryonalentwicklung, was vermutlich auf einen verstärkten Notch-Signalweg zurückgeführt werden kann (Tetzlaff et al., 2004; Tsunematsu et al., 2004). Durch konditionale Fbw7-*Knockout*-Mäuse, bei denen Fbw7 gewebespezifisch ausgeschaltet werden kann, wurde herausgefunden, dass Fbw7 eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Quieszenz und Selbsterneuerung hämatopoetischer Stammzellen spielt (Onoyama et al., 2007).

3.6.3 Usp28

Ubiquitinierung ist ein reversibler Prozess. Eine Familie von Isopeptidasen, die Deubiquitinierenden Enzyme (DUBs), ist in der Lage, die Funktion der E3-Ligasen zu antagonisieren, indem sie Ubiquitinmoleküle wieder von Substratproteinen abspalten (Nijman et al., 2005).

Die deubiquitinierenden Enzyme erfüllen mehrere wichtige Aufgaben. Ubiquitin kann als lineares Fusionsprotein aus mehreren Ubiquitin-Untereinheiten transkribiert und

translatiert werden, das erst mit Hilfe von DUBs in freie Ubiquitinmoleküle gespalten wird. DUBs können auch degradierende oder nicht-degradierende Ubiquitinketten von Substratproteinen entfernen. Dadurch wird das entsprechende Signal rückgängig gemacht; im Falle der degradierenden Ubiquitinketten kommt es zur Stabilisierung des Substratproteins und zur Verhinderung des proteasomalen Abbaus. Wird ein Substratprotein tatsächlich abgebaut, so ist die DUB-Aktivität notwendig, um die Ubiquitinmoleküle zu recyceln. Darüberhinaus können DUBs bestehende Ubiquitinketten auch modifizieren, um bestimmte Ubiquitin-vermittelte Signale zu verändern (Übersichtsartikel: (Komander et al., 2009)).

USP28 wurde in einem shRNA-Screen gefunden, in dem nach Genen gesucht wurde, die essentiell für die Myc-Funktion sind. Dabei wurde die Tatsache ausgenutzt, dass Myc-Aktivierung in der Abwesenheit von Wachstumsfaktoren zur Apoptose-Induktion führt. shRNAs, die unter diesen Bedingungen einen Überlebensvorteil bringen, hemmen Gene, ohne die eine normale Myc-Funktion nicht möglich ist. *USP28* war eines dieser Gene. Weitere Untersuchungen identifizierten *Usp28* als das deubiquitinierende Enzym, das den SCF-Fbw7-vermittelten Myc-Abbau antagonisieren kann (Popov et al., 2007b). *Usp28* gehört zur DUB-Unterfamilie der USPs (Ubiquitin-spezifische Proteasen) und ist eine Cysteinprotease, das heißt, seine katalytische Aktivität hängt von Cystein 171 ab.

Es konnte gezeigt werden, dass *Usp28* über *Fbw7 α* mit Myc interagiert, sodass die drei Proteine als ternärer Komplex im Zellkern vorliegen. Für eine direkte Interaktion zwischen DUBs und Ubiquitin-Ligasen gibt es schon weitere Beispiele, wie *Usp7* und *Mdm2* (Li et al., 2004) oder *Usp33* und *VHL* (Li et al., 2005). Diese Interaktionen vermitteln vermutlich die Spezifität der DUBs oder regulieren die Stabilität der beiden Proteine, indem die E3-Ligase vor Auto-Ubiquitinierung geschützt wird oder indem das deubiquitinierende Enzym selbst ein Substrat der E3-Ligase ist. *Usp28* deubiquitiniert und stabilisiert Myc und Zyklin E und antagonisiert so die Funktion von *Fbw7 α* . In Tumorzelllinien ist *Usp28* notwendig für die Myc-Stabilität und stellt einen limitierenden Faktor für die Proliferation dar. In humanen Tumorgeweben aus Kolon- und Brustkarzinomen konnte eine erhöhte Expression von *Usp28* nachgewiesen werden (Popov et al., 2007b). Somit wurde ein Mechanismus aufgeklärt, über den es auch ohne *MYC*-Mutationen zur Stabilisierung von Myc in Tumorzellen kommen kann.

3.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Die onkogene Aktivierung des Myc-Proteins gehört zu den häufigsten Veränderungen, die in humanen Tumoren gefunden werden. Dabei ist aktiviertes Myc oftmals die Ursache der Tumorentstehung, aber auch Tumore, die durch ein anderes mutagenes Ereignis entstanden sind, werden häufig für ihre Aufrechterhaltung von Myc abhängig.

Herauszufinden, wie das Myc-Protein reguliert wird und welche Signalwege seine Stabilität beeinflussen, wird nicht nur unser Verständnis der Tumorbiologie vertiefen, sondern auch zu neuen, zielgerichteten Therapieansätzen für Patienten mit Myc-abhängigen Tumoren führen.

(1) Deshalb war ein Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob der Abbau des Myc-Proteins durch die E3-Ligase Fbw7 von Modifikationen an Fbw7 reguliert wird. Bisher wurde die Phosphorylierung von Myc als Hauptmechanismus angesehen, über den der Proteinabbau reguliert wird. Allerdings sind weitere Ebenen der Regulation wahrscheinlich. Es sollten posttranskriptionelle Modifikationen an Fbw7 und die übergeordneten Signalwege identifiziert werden sowie deren Einfluss auf die Fähigkeit, Substrate zum Abbau zu markieren, bzw. der Einfluss auf die Stabilität von Fbw7 selbst analysiert werden.

(2) Zur Therapie von Myc-abhängigen Tumoren stellt die Inhibition der Myc-Aktivität einen vielversprechenden Ansatz dar. In experimentellen Modellen ist es bereits gelungen, durch die Inhibierung von Myc eine Tumorregression zu erreichen. Da Myc als Transkriptionsfaktor jedoch kein aktives Zentrum wie ein Enzym besitzt, das von niedermolekularen Wirkstoffen gehemmt werden kann, ist die Entwicklung von direkten Hemmstoffen für Myc problematisch. Einen alternativen Ansatz stellt die Inhibition von Proteinen dar, die für die Myc-Funktion essentiell sind. In dieser Arbeit sollte das deubiquitinierende Enzym Usp28 als ein solcher Angriffspunkt validiert werden. Da Usp28 Myc in Tumorzellen deubiquitiniert und stabilisieren kann und zur Enzymklasse der Cysteinproteasen gehört, die mit niedermolekularen Wirkstoffen gehemmt werden können, ist es ein potentiell interessantes Zielprotein für die Therapie Myc-abhängiger Tumore. Mit Hilfe eines *Knockout*-Mausmodells sollte in dieser Arbeit die Auswirkung der Usp28-Deletion auf die Gewebemöostase und die Myc-abhängige Tumorentstehung untersucht werden.

4 Materialien

4.1 Stämme und Zelllinien

4.1.1 Bakterienstämme

- DH5α *Escherichia coli*; chromosomaler Genotyp: F⁻, φ80*lacZ*ΔM15, Δ(*lacZYA-argF*)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk⁻, mk⁺), *phoA*, *supE44*, λ⁻, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*; verwendet zur Herstellung und Amplifikation von Plasmiden
- XL1 blue *Escherichia coli*, *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'* *proAB lacIqZ*ΔM15 *Tn10 (Tetr)*]
- BL21 *Escherichia coli*; chromosomaler Genotyp: B, F⁻, *dcm*, *ompT*, *hsdS*(r_B⁻m_B⁻), *gal* [*malB*⁺]_{K-12}(λ^S); verwendet zur Expression von GST-Fusionsproteinen

4.1.2 Säugerzelllinien

- HCT116 humane Kolonkarzinomzelllinie (ATCC), entweder als Wildtyp (Fbw7 +/+) oder mit Fbw7-Defizienz (Fbw7 -/-) (Rajagopalan et al., 2004)
- HEK293T humane embryonale Nierenzelllinie (ATCC)
- HeLa humane Zervixkarzinomzelllinie (ATCC)
- MEFs immortalisierte Mausembryofibroblasten, entweder als Wildtyp-Form (wt bzw. Usp28 +/+) oder mit einer hetero- bzw. homozygoten Deletion von Usp28 (Usp28 +/- bzw. Usp28 -/-)
- PHX humane Verpackungszelllinie (Phoenix-Eco) zur Herstellung von MoMuLV-Retroviren; von der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 abstammend (Kinsella and Nolan, 1996)

4.1.3 Primäre Zellen

- MEFs primäre Mausembryofibroblasten, isoliert aus Embryonen E13,5
 (Genotypen wie in 4.1.2)
- B-Zellen murine B-Lymphozyten, isoliert aus B-Zell-Lymphomen

4.1.4 Transgene Mausstämme

- Usp28 fl/fl auf einem C57BL/6-Stammhintergrund;
 konditionaler Usp28-*Knockout*;
 hergestellt von der Firma Taconic Artemis in Köln
- E μ -Myc (B6.Cg-Tg(IgHMyc)22Bri/J)
 auf einem C57BL/6-Stammhintergrund;
 exprimiert das Myc-Transgen unter Kontrolle des *Enhancers* der schweren
 Kette der Immunglobuline (E μ) und des Myc-Promotors
 (Harris et al., 1988);
 freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Tarik Möröy
- Zp3-Cre (C57BL/6-Tg(Zp3-cre)93Knw/J)
 auf einem C57BL/6-Stammhintergrund;
 exprimiert die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Zona Pellucida 3
 Promotors (Zp3);
 erworben von The Jackson Laboratory
- CreER^{T2}/ B6.129-Gt(Rosa)^{tm1(cre/ERT2)Tyj}/J
 Rosa26 auf einem C57BL/6-Stammhintergrund;
 exprimiert eine konditionale, durch Tamoxifen induzierbare Cre-
 Rekombinase (fusioniert mit der Hormonbindedomäne des
 Östrogenrezeptors) im Rosa 26-Lokus;
 freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Stefan Gaubatz

4.2 Kultivierungsmedien und Zusätze

4.2.1 Medien und Antibiotika zur Bakterienkultivierung

4.2.1.1 Medien

LB-Medium	1 % (w/v) Baktotrypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 1 % (w/v) NaCl
LB-Agar	LB-Medium mit 1,2 % (w/v) Bakto-Agar; nach Autoklavieren auf 50 °C abgekühlt, 20 ml auf eine 10 cm-Schale gegeben

4.2.1.2 Antibiotika

Je nach Resistenzgen des verwendeten DNA-Plasmids wurden dem LB-Medium oder dem LB-Agar folgende Antibiotika hinzugefügt:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	30 µg/ml

4.2.2 Medien und Zusätze für die Säugerzellkultivierung

4.2.2.1 Medien

Die Grundmedien DMEM und RPMI-1640 wurden von der Firma Sigma bezogen. Dem Medium zugesetztes fötales Kälberserum (*fetal bovine serum*, FBS; PAA) wurde vor der Verwendung 30 Minuten bei 56 °C hitzeinaktiviert.

HCT116, HEK293, HeLa, PHX	DMEM 10 % (v/v) FBS 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml, PAA)
MEFs	DMEM 10 % (v/v) FBS 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml) 1 % (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco/Invitrogen) 55 µM β-Mercaptoethanol

B-Zellen	RPMI-1640
	10 % (v/v) FBS
	1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml)
	50 µM β-Mercaptoethanol
	200 µM Asparagin
	5 % (v/v) Natriumpyruvat
	1 mM HEPES
Einfriermedium	90 % (v/v) FBS
	10 % (v/v) DMSO

4.2.2.2 Antibiotika

Zur Selektion erfolgreich transfizierter bzw. infizierter Zellen wurden diese mit folgenden Antibiotika behandelt. Eine Neomycin-Resistenz wurde mit G418 und eine Bleomycin-Resistenz mit Zeocin selektioniert.

Blastizidin S (InvivoGen)	5 - 10 µg/ml
G418 (PAA)	800 µg/ml
Puromycin (InvivoGen)	2 µg/ml
Hygromycin (Merck)	100 µg/ml
Zeocin (InvivoGen)	50 - 500 µg/ml

4.2.2.3 Weitere Zusätze

4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) (Sigma)	200 nM in Ethanol
Cycloheximid (CHX) (Sigma)	100 µg/ml in Ethanol
BEZ235 (LC Laboratories)	500 nM in DMSO
MG-132 (Calbiochem)	10 µM in Ethanol
LY290024 (Calbiochem)	50 µM in DMSO
N-Ethylmaleimid (NEM) (Sigma)	1 mM in Ethanol

4.3 Nukleinsäuren

4.3.1 Primer

Die verwendeten DNA-Primer (for = *forward*; rev = *reverse*) wurden von der Firma Metabion synthetisiert. Das Primerdesign erfolgte mit den Programmen Primer3, PrimerX (für Punktmutagenese) oder Universal ProbeLibrary (Roche; für qRT-PCR Primer). Die Primer für die quantitative RT-PCR wurden zur Vermeidung der Amplifikation genomischer DNA Intron-Exon-übergreifend entworfen.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Primer

Für die Primer ist jeweils die Bezeichnung (das amplifizierte Gen), die Verwendung (qRT-PCR = quantitative Reverse Transkriptase-PCR, gen-PCR = Genotypisierungs-PCR, mut-PCR = Mutagenese-PCR), die Spezies (H = Homo sapiens, M = Mus musculus) und die Sequenz angegeben.

Bezeichnung	Verwendung	Spezies	Sequenz (5' → 3')
Usp28 fl/fl for	gen-PCR	M	gaggcttgagttatgactgg
Usp28 fl/fl rev	gen-PCR	M	agaacacctgctgcttaagc
Usp28 del rev	gen-PCR	M	tccccaagagtgtttcac
Eμ-Myc for	gen-PCR	M	agacgctcaggtggcactttt
Eμ-Myc rev	gen-PCR	M	agcaaaaacaggaaggcaaa
Zp3-Cre for	gen-PCR	M	gcggtctggcagtaaaaactatc
Zp3-Cre rev	gen-PCR	M	gtgaaacagcattgctgtcactt
CreER 1	gen-PCR	M	tgggatacagaagaccaatgc
CreER 2	gen-PCR	M	acggacagaagcattttcca
CreER 3	gen-PCR	M	gtctctgctccagagtgtct
Fbw7 S227A for	mut-PCR	H	cgacgccgaattacagctgtccagccacctac
Fbw7 S227A rev	mut-PCR	H	gtaggtggctggacagctgtaattcggcgtcg
B2M for	qRT-PCR	M	agccgaacatactgaactgtactg
B2M rev	qRT-PCR	M	cggccatactgtcatgcttaactc
Usp28-Exon4/5 for	qRT-PCR	M	ccattgccttgagtctcctg
Usp28-Exon4/5 rev	qRT-PCR	M	ccaacattttcagcccaac
B2M for	qRT-PCR	H	gtgctcgcgtactctctc

B2M rev	qRT-PCR	H	gtcaacttcaatgtcggat
Fbw7 for	qRT-PCR	H	gaaccccagttcaacgaga
Fbw7 rev	qRT-PCR	H	ttgggtccaggaatgaaag
LDHA for	qRT-PCR	H	tctctgtagcagattggcaga
LDHA rev	qRT-PCR	H	aagacatcatcctttattccgtaa
GLUT1 for	qRT-PCR	H	ggttgtgccatactcatgacc
GLUT1 rev	qRT-PCR	H	cagataggacatccagggtagc
PFKL for	qRT-PCR	H	acaccctgtaactgtgctg
PFKL rev	qRT-PCR	H	atgcccattcttgctgctc
ENO1 for	qRT-PCR	H	tcccacatcctggagaataa
ENO1 rev	qRT-PCR	H	atgccgatgaccacctatc
LDHB for	qRT-PCR	H	ccaaccagtgacattctt
LDHB rev	qRT-PCR	H	aaacacctgccacattcaca
ODC1 for	qRT-PCR	H	aaaacatgggcgcttacact
ODC1 rev	qRT-PCR	H	tggaattgctgcatgagttg
CDH2 for	qRT-PCR	H	gacaatgccctcaagtgtt
CDH2 rev	qRT-PCR	H	ccattaagccgagtgatggt
ITGA2 for	qRT-PCR	H	gggcattgaaaacactcgat
ITGA2 rev	qRT-PCR	H	tcggatcccaagattttctg
CCND2 for	qRT-PCR	H	ggacatccaacctacatgc
CCND2rev	qRT-PCR	H	cgcacttctgttctcacag
Cdc25c for	qRT-PCR	H	tggattctcaggacttcagg
Cdc25c rev	qRT-PCR	H	gctgggctacatttcattaggt
Bim S for	qRT-PCR	H	catcgcggtattcgggtc
Bim S rev	qRT-PCR	H	gctttgccatttggtctttt
Bcl2 for	qRT-PCR	H	tacctgaaccggcacctg
Bcl2 rev	qRT-PCR	H	gccgtacagtccacaaagg

4.3.2 Plasmide

4.3.2.1 Leervektoren

pcDNA3.0	eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV (Cytomegalie-Virus)-Promotor (Invitrogen)
pBabe bleo/hygro/puro	eukaryotischer retroviraler Expressionsvektor mit LTR-Promotor und Bleomycin-, Hygromycin- oder Puromycin-Resistenzgen (Morgenstern and Land, 1990)
pGEX4T3	bakterieller Expressionsvektor mit einem tac-Promotor zur IPTG-induzierbaren Expression von GST-Fusionsproteinen (GE Healthcare)

4.3.2.2 Expressionsvektoren

p3xFLAG-CMV- <i>FBXW7</i> α - <i>WT</i>	Expressionsvektor mit CMV-Promotor, dreifachem FLAG-Tag und der CDS von humanem <i>FBXW7</i> α -Wildtyp, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Bruce Clurman
p3xFLAG-CMV- <i>FBXW7</i> α - <i>S227A</i>	wie oben, allerdings wurde die Punktmutation S227A eingeführt
pcDNA3-HA- <i>SKP1</i>	Expressionsvektor mit CMV-Promotor, HA-Tag und der CDS von humanem <i>SKP1</i>
pcDNA3-HA- <i>FBXW7</i> α - <i>WT</i>	Expressionsvektor mit CMV-Promotor, HA-Tag und der CDS von humanem <i>FBXW7</i> α -Wildtyp

pCS2m- <i>Zyklin E</i>	Expressionsvektor mit CMV-Promotor, Myc- <i>Tag</i> und der CDS von humanem <i>Zyklin E</i> , freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Bruce Clurman
pcDNA3-His ₆ -Ubiquitin	Expressionsvektor mit CMV-Promotor, Hexa-Histidin- <i>Tag</i> und der CDS von Ubiquitin
pBabe puro <i>FBXW7</i> α- <i>WT</i>	pBabe puro Vektor mit der CDS von humanem <i>FBXW7</i> α-Wildtyp
pBabe puro <i>FBXW7</i> α- <i>S227A</i>	pBabe puro Vektor mit der CDS von humanem <i>FBXW7</i> α- <i>S227A</i>
pBabe puro Cre	pBabe puro mit der kodierenden Sequenz für die Cre-Rekombinase
pGEX4T3 <i>FBXW7</i> α- <i>WT</i> bzw. – <i>S227A</i>	pGEX4T3 Vektor mit der kodierenden Sequenz der ersten 250 Aminosäuren von <i>FBXW7</i> α- <i>WT</i> bzw. <i>S227A</i>
pGEX4T3 <i>FOXO3A fl</i> bzw. 1- 915	pGEX4T3 Vektor mit der kodierenden Sequenz von <i>FOXO3A</i> Gesamtlänge oder Aminosäuren 1 bis 915

4.4 Antikörper

4.4.1 Primärantikörper

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Spezies: H = Homo sapiens; M = Mus musculus

Verwendung: WB = Immunoblot; IP = Immunpräzipitation; IF = Immunfluoreszenz

Antikörpertyp: M = Maus; K = Kaninchen; mono = monoklonal; poly = polyklonal

Protein	Spezies	Verwendung	Antikörpertyp	Antikörperbezeichnung
FLAG	synth.	WB, IP, IF	M, mono	Sigma (Klon M2, F3165)
Phospho-Akt-Substrat	alle	WB, IP	K, mono	Cell Signaling (110B7E)
Phospho-Myc (T58/S62)	H, M	WB	K, poly	Cell Signaling (9401)
mTOR	H, M	WB	K, poly	Cell Signaling (2972)
c-Myc	H, M	WB	M, mono	Santa Cruz (C-33, sc-42)
c-Myc	H	WB	M, mono	9E10, eigene Herstellung
Cdk2	H,M	WB	K, poly	Santa Cruz (sc-163)
Mcl-1	H, M	WB	K, poly	Santa Cruz (S-19, sc-19)
Zyclin E	H	WB	M, mono	Santa Cruz (HE12, sc-247)
SREBP-1	H, M	WB	M, mono	Santa Cruz (2A4, sc-13551)
HA	synth.	WB	M, mono	Covance (Klon 16B12, MMS-101P)
Usp28	H, M	WB	K, poly	Acris (17707-1-AP)
β -Aktin	H, M	WB	M, mono	Sigma (Klon AC-15, A5441)
c-Myc	H, M	WB	M, mono	Calbiochem (Ab-3, OP31)
Zyclin E	H, M	WB	K, poly	Santa Cruz (M-20, sc-481)
53BP1	H, M	WB	K, poly	Santa Cruz (H-300, sc-22760)
Phospho-Chk1 (S345)	H, M	WB	K, mono	Cell Signaling (133D3, 2348)
Phospho-p53 (S15)	H, M	WB	K, poly	Santa Cruz (sc-11764-R)
p53	M	WB	K, poly	Novocastra Lab. (CM5)

c-Myc	H, M	WB	K, poly	Santa Cruz (N-262, sc-764)
Zyklin D1	M, H	WB	M, mono	Santa Cruz (72-13G, sc-450)
Fbw7 γ (Cdc4)	M, H	WB	K, poly	Santa Cruz (H-300, sc-33196)
Fbw7 α	M, H	WB	M, mono	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Axel Behrens
phospho-Myc (S62)	M, H	WB	K, poly	Abcam (ab51156)
ARF	M, H	WB	K, poly	Abcam (R562)
Vinculin	M, H	WB	M, mono	Sigma-Aldrich (V9131)

4.4.2 Sekundärantikörper

anti-Kaninchen-HRP Esel-anti-Kaninchen-Immunglobulin, gekoppelt an die Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) (Amersham, NA 934)

anti-Maus-HRP Esel-anti-Maus-Immunglobulin, gekoppelt an die Meerrettichperoxidase (Amersham, NA 931)

anti-Maus-Alexa488 Ziege-anti-Maus-Immunglobulin, gekoppelt an Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, A11001)

4.5 Chemikalien

Mit Ausnahme von einigen gesondert aufgeführten Substanzen wurden Chemikalien in Analysequalität oder in Qualität für die Molekularbiologie von den Firmen Sigma, Roth, Acros Organics und Appllichem verwendet. Von Sigma und Invitrogen wurden Feinchemikalien in höchstem Reinheitsgrad bezogen. Radioaktiv markiertes ATP (^{32}P - γ -ATP) wurde von Hartmann Analytics erworben.

4.6 Standards und Enzyme

4.6.1 Standards

Protein-Marker	PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)
DNA-Marker	1 kb DNA Ladder (Invitrogen)

4.6.2 Enzyme und Kits

Benzonase	Novagene/VWR International
DNase-freie RNase A	Sigma
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
Restriktionsendonukleasen	Fermentas oder NEB (New England Biolabs)
RNase-freie DNase	Fermentas
Pfu-Turbo Polymerase	Stratagene
Pfu Polymerase	Fermentas
Qiaquick PCR purification Kit	Qiagen
SYBR Green qPCR Master Mix	Thermo Scientific
T4-DNA-Ligase	Fermentas

4.7 Puffer und Lösungen

ACK-Lysepuffer	150 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 100 mM EDTA mit HCl auf pH 7,4 eingestellt und sterilfiltriert
Basischer Puffer für genomische DNA (50x)	1,25 M NaOH 10 mM EDTA, pH 12
Blockierungslösung für PVDF-Membranen	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T 5 % (w/v) bovines Serumalbumin in TBS-T
Blockierungslösung für Immunfluoreszenz	5 % (v/v) FBS 0,1 % (v/v) NP-40 in PBS

Materialien

Bradfordlösung	8,5 % (v/v) Ortho-Phosphorsäure 4,75 % (v/v) Ethanol 0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 durch Papierfilter filtriert
Coomassie-Färbelösung	25 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,05 % (w/v) Coomassie G250 Farbstoff
Coomassie-Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure 20 % (v/v) Methanol
Denaturierender Lysepuffer	2 % (v/v) SDS 20 mM EDTA 50 mM Tris, pH 8
DEPC-Wasser	0,1 % (v/v) DEPC in <i>aqua bidest.</i> über Nacht bei 37 °C inkubiert, autoklaviert
DNA Ladepuffer (6x)	40 % (w/v) Saccharose; pH 8,0 0,2 % (w/v) Bromphenolblau 0,2 % (w/v) Xylencyanol 10 mM EDTA
Färbelösung für die SA-β-Gal-Färbung	1 mM MgCl ₂ 1 mg/ml X-Gal (in DMF) 0,12 mM K ₃ Fe(CN) ₆ 0,12 mM K ₄ Fe(CN) ₆ in PBS, pH 6,0
GST-Elutionspuffer	50 mM Tris-Hcl 10 mM reduziertes Glutathion pH 8,0
HBS (2x)	280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM HEPES mit NaOH auf pH 7,05 eingestellt, sterilfiltriert
Kinase-Puffer	50 mM Tris, pH 7,4 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 10 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 100 mM NaF

	2 mM Na ₃ VO ₄
Kristallviolettlösung	0,1 % (w/v) Kristallviolett 20 % (v/v) Ethanol
Mowiollösung	13,3 % (w/v) Mowiol 4-88 33,3 % (v/v) Glycerin 0,13 M Tris, pH 8,5
Neutralisations Puffer für genomische DNA (50x)	2 M Tris-HCl, pH 5,0
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ 1,76 mM KH ₂ PO ₄ autoklaviert
PI-FACS-Puffer	38 mM Natriumcitrat 54 µM Propidiumiodid 24 µg/ml Rnase A
Puffer 1 (für die Aufreinigung von Plasmid-DNA)	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 100 mM EDTA 100 µg/ml RnaseA
Puffer 2 (für die Aufreinigung von Plasmid-DNA)	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Puffer 3 (für die Aufreinigung von Plasmid-DNA)	3,1 M Kaliumacetat, pH 5,5
RIPA-Lysepuffer	150 mM NaCl 1 % (v/v) NP-40 0,5 % (w/v) DOC 0,1 % (w/v) SDS 50 mM Tris pH 7,5
Sammelgel 4 %	4 % (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid 125 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,1 % (w/v) SDS

Materialien

	0,1 % (w/v) APS 0,1 % (v/v) TEMED
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-Base 250 mM Glycin 0,1 % SDS
SDS-Probenpuffer (3x)	187,5 mM Tris pH 6,8 30 % (v/v) Glycerin 0,03 % Bromphenolblau 2 M β -Mercaptoethanol
<i>Stripping</i> -Puffer	62,5 mM Tris pH 6,8 2 % (w/v) SDS 100 mM β -Mercaptoethanol
TAE (50x)	2 M Tris 5,7 % Essigsäure 50 mM EDTA pH 8,0
Tankblot-Puffer (10x)	1,9 M Glycin 250 mM Tris-Base 0,05 % SDS pH 8,0
TBS (20x)	500 mM Tris Base 2,8 M NaCl pH 7,4
TBS-T	0,2 % Tween-20 25 mM Tris 140 mM NaCl pH 7,4
TE	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0
TNT Lysepuffer	20 mM Tris-HCl, pH 8 250 mM NaCl 1 % (v/v) Triton X-100

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
Trypsinlösung	0,25 % Trypsin 5 mM EDTA 22,3 mM Tris pH 7,4 125 mM NaCl
Ubi-Lysepuffer	150 mM NaCl 25 mM Tris pH 7,4 5 mM MgCl ₂

4.8 Gebrauchsmaterialien

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

4.9 Geräte, Membranen und Filme

Blottingapparatur	Mini Wet Blot (biotech service blu)
Durchflusszytometer	BD FACS Canto II (BD Biosciences)
Entwicklermaschine	Protec Compact 35 (Medtec) LAS-4000 (Fujifilm Global)
Fluoreszenzmikroskop	DMI 6000 B (Leica)
Heizblock	Dry Bath System (STARLAB)
Homogenisator	IKA [®] T18 basic, Ultra-Turrax [®]
Mikroskop	Axiovert 40CFL (Zeiss)
PCR-Gerät	Mastercycler [®] pro S (Eppendorf)
Photometer	Ultrospec [™] 3100 <i>pro</i> UV/Visible (Amersham Biosciences) Spektrofluorometer NanoDrop 3000 (Thermo Scientific)

PVDF Transfer Membran	Immobilon-P Transfer Membran (Millipore)
qRT-PCR	Mx3000P (Stratagene)
Röntgenfilme	Fuji Super RX (Fujifilm)
Schüttelinkubator	Model G25 (New Brunswick Scientific)
SDS-PAGE-Apparatur	Minigel (Bio-Rad) Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad)
Sonifiziergerät	W-250 D (Heinemann)
Spannungsquellen	Power Pac (Bio-Rad)
Sterilwerkbank	HeraSafe (Heraeus)
Universalschüttler	SM-30 (Edmund Bühler GmbH)
UV-Tisch	Maxi-UV-Leuchttisch (PEQLAB)
Wasserbad	Julabo ED-5M Bad/Umwälzthermostat (Julabo)
Whatman-Filterpapier	Gel-Blotting Papier (Schleicher und Schuell)
Zellkulturinkubator	BBD 6220 (Heraeus)
Zellzähler	CASY® Zellzähler (Innovatis)
Zentrifugen	Galaxy MiniStar (VWR International) Eppendorf 5417 R (Eppendorf) Eppendorf 542 (Eppendorf) Multifuge 1S-R (Heraeus) Avanti J-26 XP® (Beckman Coulter)

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA und Plasmidamplifikation

Mittels Transformation kann temperaturabhängig zirkuläre DNA in Bakterien eingebracht werden, was mit der Vermehrung der Bakterien zur Amplifikation des entsprechenden Plasmids führt. Chemisch kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 µg Plasmid-DNA bzw. dem Ligationsansatz gemischt. Nach einer dreißigminütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für eine Minute. Der Ansatz inkubierte 2 Minuten auf Eis und nach Zugabe von Antibiotikum-freiem LB-Medium wurden die Bakterien 45 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde dann entweder abzentrifugiert, in 100 µl Medium aufgenommen und auf einer antibiotikahaltigen Agarplatte ausgestrichen oder direkt in 200 ml antibiotikahaltiges LB-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C zur Plasmidamplifikation kultiviert.

5.1.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Für die Isolation größerer Mengen eines Plasmids nach Amplifikation (Maxi-Präparation) wurde eine 200 ml-Übernachtskultur gemäß den Angaben des Herstellers (JETSTAR 2.0 Plasmid Purification Maxi Kit, Genomed) verarbeitet. Das aufgereinigte Plasmid wurde in aqua bidest. gelöst, auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt und bei -20 °C gelagert.

Für die Aufreinigung kleinerer Mengen Plasmid-DNA (Mini-Präparation) wurden eine 2 ml-Übernachtskultur abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 150 µl Puffer 1 resuspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 150 µl Puffer 2 zugegeben und nach einer weiteren dreiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden durch Zugabe von 150 µl Puffer 3 die Proteinbestandteile denaturiert. Zur DNA-Fällung wurden die Proben abzentrifugiert (2.500 x g, 10 min, 4 °C) und der Überstand mit 1 ml 95 %igem Ethanol versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde die DNA abzentrifugiert (18.000 x g, 10 min, 4 °C) und das Pellet in 50 µl aqua bidest. gelöst.

5.1.3 Isolierung von genomischer DNA aus Mausproben und Zellkulturzellen

Zur Isolierung genomischer DNA wurde Mausgewebe (z. B. 1 cm des Mausschwanzes, ein Organstück, ein Embryokopf) oder ein Zellpellet aus der Zellkultur mit 75 bis 150 µl Basenpuffer (1x) für 30 Minuten bei 95 °C inkubiert und danach auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 75 bis 150 µl Neutralisierungspuffer (1x) wurde der Ansatz gut vermischt und bei 4 °C gelagert. Für die Genotypisierungs-PCR wurden 2 µl dieses Ansatzes eingesetzt.

5.1.4 Messung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration von DNA oder RNA in einer Lösung wurde mit Hilfe des NanoDrop 1000 (PeqLab) bestimmt. Neben der Konzentration wurde vom Gerät auch die Reinheit der gemessenen Nukleinsäure angegeben. Diese ermittelte sich aus dem Verhältnis der Absorption bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) zur Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren). Der Quotient sollte für DNA bei ungefähr 1,8 und bei RNA bei 2,0 liegen.

5.1.5 Sequenzspezifische Hydrolyse von DNA (Restriktion)

Die sequenzspezifische Hydrolyse von DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (Fermentas oder New England Biolabs) mit den vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffern. Bei gleichzeitiger Hydrolyse mit zwei Restriktionsendonukleasen wurde der Reaktionspuffer genutzt, bei dem beide Enzyme eine ausreichend hohe katalytische Aktivität zeigten. Es wurde folgender Ansatz verwendet und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert:

Restriktionsansatz: 1 µg DNA
 0,5 µl Restriktionsendonuklease 1
 0,5 µl Restriktionsendonuklease 2 (gegebenenfalls)
 1 µl 10x Reaktionspuffer
 ad 10 µl aqua bidest.

5.1.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Um die Größe von DNA-Fragmenten nach einem Restriktionsverdau zu überprüfen oder um DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe aufzutrennen, wurde je nach erwarteter Fragmentgröße eine Lösung von 1 – 2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer aufgekocht, mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in einen Gelträger mit Gelkämmen gegossen. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen des abgekühlten Agarosegels pipettiert. Zum Größenvergleich wurden 1,5 µl eines DNA-Größenstandard (1 kb DNA Ladder, Invitrogen) neben den Proben aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Proben erfolgte für eine Stunde bei 120 V. Die aufgetrennten DNA-Fragmente konnten durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid auf einem UV-Leuchttisch sichtbar gemacht werden.

5.1.7 DNA-Extraktion aus einem Agarosegel

Das gewünschte DNA-Fragment wurde nach der gelelektrophoretischen Auftrennung mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die Gelextraktion erfolgte mit Hilfe des Gel Extraction Kits (QIAGEN) entsprechend den Angaben des Herstellers.

5.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Um doppelsträngige DNA-Fragmente kovalent zu verknüpfen (Ligation) wurde ein dreifacher molarer Überschuss des Inserts verglichen mit der Menge an Plasmid-DNA eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Ligationsansatz: 100 - 200 ng linearisiertes Plasmid
 x ng DNA-Fragment (Insert)
 1 µl T4 DNA-Ligasepuffer (Fermentas)
 1 µl T4 DNA-Ligase (Fermentas)
 ad 10 µl aqua bidest.

5.1.9 Isolation von RNA

Zur Isolation von Gesamt-RNA wurde das TriFast Reagenz (peqLab) verwendet. Um RNA aus einem Stück Mausorgan zu isolieren wurde 1 ml TriFast Reagenz auf das Gewebe gegeben und dieses zunächst mit Hilfe des Homogenisators zerkleinert. Ein Zellpellet aus der Zellkultur wurde direkt in 1 ml TriFast resuspendiert. In beiden Fällen wurde nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur 200 µl Chloroform zugegeben und die Probe gründlich gemischt (15 Sekunden vortexen) und nach weiteren 3 Minuten zentrifugiert (18.000 x g, 10 min, 4 °C). Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Zum Fällern wurde die Probe mindestens 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert (18.000 x g, 10 min, 4 °C). Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 75 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl DEPC-Wasser gelöst. Nach Einfrieren bei -80 °C und anschließendem Wiederauftauen wurde die RNA-Konzentration bestimmt und die RNA gegebenenfalls für die cDNA-Synthese verwendet.

5.1.10 cDNA-Synthese

Um die Expression bestimmter mRNAs zu analysieren, wurden die in der Gesamt-RNA enthaltenen mRNAs durch eine reverse Transkription mit Hilfe von Zufallshexanukleotid-Primern und des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. 2 µg Gesamt-RNA wurden auf ein Volumen von 10 µl mit DEPC-Wasser verdünnt, eine Minute bei 65 °C inkubiert um Sekundärstrukturen aufzulösen und dann auf Eis gestellt. Nach Zugabe des cDNA-Syntheseansatzes wurden die Proben für 10 Minuten bei Raumtemperatur, für 50 Minuten bei 37 °C und für 15 Minuten bei 70 °C inkubiert. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

cDNA-Syntheseansatz: 10 µl 5x First Strand Buffer (Invitrogen)
 5 µl DTT (0,1 M, Invitrogen)
 5 µl dNTPs (2,5 mM, Roth)
 2 µl Random-Primer p(dN)₆ (2 mg/ml)
 0,2 µl RNAsin Plus (Promega)

1 µl M-MLV reverse Transkriptase (200 U/µl, Promega)

ad 40 µl DEPC-Wasser

5.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Amplifikation von Nukleinsäuren und wurde für folgende Zwecke eingesetzt:

PCR zur Herstellung von Expressionsvektoren:

Zur Generierung von Expressionsvektoren wurde das Gen entweder aus einem bereits vorhandenen Vektor oder ausgehend von cDNA amplifiziert. Somit konnten im Zuge der PCR-Reaktion auch neue Restriktionsschnittstellen angefügt werden.

PCR-Reaktionsansatz: 2,5 µl 10x Pfu Puffer (Stratagene)
 0,5 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
 50 ng Ausgangsplasmid / 1 µl cDNA
 10 pmol Primer 1
 10 pmol Primer 2
 1 µl DMSO
 1 µl dNTPs (2,5 mM)
 ad 25 µl aqua bidest.

PCR-Temperaturprofil: 1 Zyklus 95 °C 5 Minuten
 30 Zyklen 95 °C 30 Sekunden
 60 °C 30 Sekunden
 72 °C 3 Minuten
 1 Zyklus 72 °C 5 Minuten

Zielgerichtete Mutagenese-PCR:

Bei der zielgerichteten Mutagenese-PCR wurden die Primer so gewählt, dass einzelne Basen im Vergleich zur Wildtyp-DNA abgeändert waren. Dadurch konnten mit einer PCR-Reaktion einzelne Basen in der Ziel-DNA ausgetauscht und somit die Aminosäuresequenz des kodierten Proteins verändert werden. Nach der PCR-Reaktion wurde der Ansatz mit dem Enzym DpnI für eine Stunde bei 37 °C verdaut, um das wildtypische, methylierte Ausgangsplasmid zu hydrolysieren. PCR-generierte DNA ist nicht methyliert und wird somit durch DpnI nicht geschnitten.

PCR-Reaktionsansatz: 2,5 µl 10x Pfu Puffer (Stratagene)
 0,5 µl Turbo Pfu Polymerase (Stratagene)
 50 ng Ausgangsplasmid
 10 pmol Primer 1
 10 pmol Primer 2
 1 µl DMSO
 0,5 µl dNTPs (2,5 mM)
 ad 25 µl aqua bidest.

PCR-Temperaturprofil: 1 Zyklus 94 °C 3 Minuten
 20 Zyklen 95 °C 30 Sekunden
 66 °C 30 Sekunden
 67 °C 5 - 10 Minuten
 1 Zyklus 72 °C 3 Minuten

Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR):

Zur quantitativen Bestimmung der Menge von bestimmten mRNAs wurde die durch die Reverse Transkriptase (RT) synthetisierte cDNA in einer Echtzeit-PCR (*real-time* PCR) amplifiziert. Dafür wurde der PCR-Reaktionsansatz gemischt, in die Reaktionsgefäße vorgelegt und 1 µl der cDNA zugegeben.

PCR-Reaktionsansatz: 5 μ l SYBR Green Mix (Thermo Scientific)
1 μ l Primer 1 (10 pmol/ μ l)
1 μ l Primer 2 (10 pmol/ μ l)
12 μ l Nuklease-freies Wasser

PCR-Temperaturprofil: 1 Zyklus 95 °C 15 Minuten
38 Zyklen 95 °C 30 Sekunden
60 °C 20 Sekunden
72 °C 15 Sekunden
1 Zyklus 95 °C 1 Minute
60 °C 30 Sekunden
95 °C 30 Sekunden

Die Quantifizierung der mRNA-Mengen erfolgte durch eine adaptive Grundlinie und einen amplifikations-basierten Schwellenwert. Dabei erfolgte die Berechnung unter der Annahme einer Amplifikationseffizienz von 1 mit Hilfe der relativen C_T -Methode (Applied Biosystems User Bulletin #2). Das Gen *B2M* (Beta-2-Mikroglobulin) diente zur Normalisierung. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt und die Standardabweichung nach dem Gaußschen Fehlerfortpflanzungsgesetz bestimmt.

5.2 Zellbiologische Methoden

Um Kontaminationen durch Pilze und Bakterien zu vermeiden, wurden Zellkulturarbeiten ausschließlich an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Zellen wurden in einem Zellkulturinkubator (Begasungsbrutschrank) BBD 6220 von Heraeus bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO₂ kultiviert.

5.2.1 Auftauen von Zellen

Die in einem Kryogefäß tiefgefrorenen Zellen wurden bei 37 °C im Wasserbad schnell aufgetaut und dann auf eine 10 cm-Zellkulturschale mit 10 ml Medium pipettiert. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde das Medium gewechselt, um das im Einfriermedium enthaltene DMSO zu entfernen.

5.2.2 Passagieren von Zellen

Adhärente Zellen wurden passagiert, bevor sie die Oberfläche der Zellkulturschale vollständig bedeckt hatten. Eine Ausnahme bildeten primäre murine embryonale Fibroblasten (MEFs), die erst bei vollständiger Bedeckung der Oberfläche passagiert werden durften. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und 1 ml Trypsinlösung auf eine 10 cm-Zellkulturschale gegeben. Nach 5 Minuten bei 37 °C waren die Zellen abgelöst und die Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von 9 ml Medium abgestoppt. Durch mehrmaliges auf- und abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und die Zellzahl gegebenenfalls entweder in einer Neubauer-Zählkammer oder mit Hilfe des CASY-Zellzählers (Innovatis) bestimmt. Die Zahl der Zellen, die passagiert oder für einen Versuch ausgesät wurden, richtete sich nach der Größe der Zellen und der Kulturschale, sowie der Proliferationsrate und der Dauer des Experiments. Es wurde jedoch darauf geachtet, dass die Zellen bei Versuchsende noch keine 100 %ige Konfluenz erreicht hatten.

Suspensionszellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren der Suspension vereinzelt, ein Teil davon in eine frische Zellkulturflasche überführt und mit frischem Zellkulturmedium aufgefüllt.

5.2.3 Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen wie bereits beschrieben mit Trypsinlösung abgelöst, in Medium resuspendiert und pelletiert (5 min, 400 x g, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 300 µl Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryogefäß überführt. Mit Hilfe eines MrFROSTY-Gefäßes wurden die Zellen im -80 °C-Gefrierschrank langsam abgekühlt und langfristig in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert.

5.2.4 Transfektion von Plasmid-DNA

Zur Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen wurde je nach Zelllinie eine der beiden hier beschriebenen Methoden gewählt. Bei einer transienten Transfektion wurden die Zellen 48 Stunden nach der Transfektion für die weitere Analyse verwendet. Zur stabilen Transfektion wurde ein Plasmid mit einem Resistenzgen gegen ein Antibiotikum verwendet. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion mit dem jeweiligen Antibiotikum behandelt, sodass selektiv nur die Zellen überleben, die das Plasmid enthalten. Die Selektion der Zellen war abgeschlossen, wenn keine Zellen einer nicht transfizierten Kontrollplatte mehr lebten.

5.2.4.1 Komplexierung von DNA mit Kalziumphosphat

Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion auf 10 cm-Kulturschalen ausplattiert. Zur Transfektion wurden pro Ansatz 500 µl einer DNA-Kalziumchlorid-Mischung hergestellt. Diese wurde unter Vortexen langsam zu 500 µl 2x HBS getropft, wobei sich die Kalziumphosphat-DNA-Komplexe ausbildeten. Das Transfektionsgemisch wurde sofort gleichmäßig auf die Zellen pipettiert. 12 - 16 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt.

DNA-Kalziumchlorid-Mischung 5 – 20 µg Plasmid-DNA
50 µl CaCl₂ (2,5 M)
ad 500 µl aqua bidest.

5.2.4.2 Transfektion mit Polyethylenimin (PEI)

Als weitere Transfektionsmethode wurde auch Polyethylenimin verwendet. Die Zellen wurden 24 Stunden vor der Transfektion auf 10 cm-Kulturschalen in Vollmedium ausplattiert. 4 Stunden vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel zu Transfektionsmedium (2 % FCS, ohne Antibiotika). Für die Transfektion wurden einerseits 10 µg DNA mit 300 µl PBS, andererseits 20 µl PEI (1 µg/µl) mit 300 µl PBS versetzt und jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die beiden Lösungen wurden gemischt und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung wurde auf die Zellen getropft und spätestens nach 4 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Vollmedium versetzt.

5.2.5 Retrovirale Infektion von Säugerzellen

Die retrovirale Infektion bietet den Vorteil, dass die Plasmid-DNA in das Genom der Zielzellen integriert und somit eine stabile Expression erreicht wird. Da hierzu das *Moloney Murine Leukaemia Virus* (Mo-MuLV) verwendet wurde, das nur Maus- bzw. Rattenzellen infizieren kann, mussten humane Zelllinien vor der Infektion mit dem murinen ekotrophen Rezeptor transfiziert werden.

Rekombinante Retroviren wurden mit Hilfe der Verpackungszelllinie Phoenix-Eco (PHX) hergestellt. Sie stammt von der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293T (ursprünglich HEK293) ab, die mit E1A und dem T-Antigen transformiert wurde (Kinsella and Nolan, 1996). Die PHX-Zellen exprimieren die viralen Genbereiche *gag*, *env* und *pol* unter Verwendung einer Resistenz gegen Diphtheria-Toxin und Hygromycin.

1 Million PHX-Zellen wurden pro 6 cm-Kulturschale ausplattiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion von 10 µg geeigneter retroviraler Expressionsvektoren (z. B. pBabe). Die Zellen produzieren daraufhin rekombinante Retroviren und geben sie in den Zellkulturüberstand ab. 12 - 16 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Der erste Virusüberstand konnte 48 Stunden nach der Transfektion abgenommen werden. Den PHX-Zellen wurde erneut frisches Medium zugegeben und nach weiteren 24 Stunden der zweite Virusüberstand abgenommen. Der Virusüberstand wurde über ein Spritze mit einem 45 µm-Filteraufsatz in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt, um sicherzustellen, dass keine PHX-Zellen zu den zu infizierenden Zellen gegeben werden. Wurde der Virusüberstand nicht sofort verwendet, konnte er in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert werden.

Für die Infektion von Zellen mit den rekombinanten Retroviren wurden diese 24 Stunden vor der Infektion auf 6 cm-Kulturschalen ausplattiert. Ein 3 ml-Aliquot des Virusüberstands wurde gegebenenfalls im 37 °C-Wasserbad aufgetaut und mit 2 ml frischem Vollmedium und 5 µl Polybren (Hexadimethrinbromid, Sigma, 4 µg/µl) gemischt. Das Medium der Zellen wurde abgenommen und das Infektionsgemisch darauf gegeben. Die Zellen wurden für 16 Stunden inkubiert, bevor 5 ml Vollmedium zugegeben wurden. 48 Stunden nach der Infektion begann die Behandlung mit Antibiotika. Dabei wurde der Zeitpunkt einer erfolgreich abgeschlossenen Selektion durch Vergleich mit einer nicht infizierten Zellschale bestimmt.

5.2.6 Behandlung von Zellen mit UVB-Strahlung

Um eine DNA-Schadensantwort auszulösen, wurden Zellen mit UVB-Licht bestrahlt. Dafür wurde das Medium abgesaugt und die Zellschale ohne Deckel für eine Minute unter die UVB-Lampe gestellt (was einer Strahlendosis von ca. 500 J/m² entspricht). Danach wurden die Zellen wieder mit Medium versetzt und zu den entsprechenden Zeitpunkten nach der Bestrahlung geerntet.

5.2.7 Kumulative Wachstumskurve

Um das Wachstumsverhalten verschiedener Zelllinien zu vergleichen, wurden sie in identischer Zellzahl (140.000) in Triplikaten auf 6 cm-Schalen ausplattiert. Die Zellen wurden nun jeden zweiten Tag durch Trypsinisieren abgelöst und mit dem CASY-Zellzähler die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt. Anschließend wurde jeweils wieder die ursprüngliche, identische Zellzahl (140.000) ausplattiert. Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass die Zellen immer in einer gleichmäßigen Dichte wachsen und nicht zum Ende der Wachstumskurve durch zu hohe Dichte arretieren. Aus den Werten wurde dann jeweils die Wachstumsrate (*fold increase in cell number*, $R = X/140.000$, wobei X die gezählte Anzahl lebender Zellen ist) und die kumulative Zellzahl (Y) bei jeder Passage (p) berechnet ($Y_{(p)} = Y_{(p-1)} \times R$) und als Kurve dargestellt.

5.2.8 Propidiumiodid-Durchflusszytometrie (PI-FACS)

Die Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) basiert auf der Laser-vermittelten Anregung fluoreszierender Farbstoffe und der Messung der Farbstoffintensität einzelner Zellen. Zur Zellzyklusanalyse eignet sich die Bestimmung des DNA-Gehalts der Zellen mit Hilfe eines interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoffs, wie z. B. Propidiumiodid (PI). Der DNA-Gehalt ermöglicht hierbei eine Unterscheidung der Zellzyklusphasen G1/G0 (DNA-Gehalt 2N), S (>2N, <4N) und G2/M (4N). Darüber hinaus können polyploide Zellen (>4N) sowie apoptotische Zellen (subG1, <2N) identifiziert werden.

Um bereits abgelöste, apoptotische Zellen in die Messung mit einzubeziehen, wurde das Medium in ein 15 ml-Probenröhrchen überführt. Die adhärennten Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch Trypsinlösung abgelöst, im Zellkulturüberstand resuspendiert und

zentrifugiert (400 x g; 5 min; 4 °C). Das Zellpellet wurde mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 1 ml kaltem PBS aufgenommen und tropfenweise unter Vortexen in ein 15 ml-Polystyrol-Probenröhrchen mit 4 ml kaltem Ethanol abs. gegeben. Die ethanolfixierten Zellen wurden über Nacht (oder länger) bei -20 °C gelagert.

Am Tag der FACS-Messung wurden die Zellen zentrifugiert (400 x g; 5 min; 4 °C), mit kaltem PBS gewaschen und resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das Zellpellet in 500 µl PBS aufgenommen und 1 µl RNase A und 15 µl Propidiumiodidlösung dazugegeben. Nach gründlicher Durchmischung wurden die Proben für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Überführung in FACS-Röhrchen wurden die Proben am Durchflusszytometer (BD FACSCanto II) bei 488 nm Anregungswellenlänge und mit einem 556 nm Langpass- und einem 585/42 nm Bandpassfilter für Propidiumiodid (Emission 617 nm) gemessen. Ein Ausschluss von Zellaggregaten erfolgte durch Ausgrenzen hoher Signalweite bei der Auswertung. Zur Analyse der Zellzyklusverteilung wurde das Programm BD FACSDiva 6.1.2 verwendet.

5.2.9 Kristallviolett-färbung

Bei Kristallviolett handelt es sich um einen violetten Triphenylmethanfarbstoff, der zur Färbung von Zellen auf Kulturschalen verwendet wird. Dadurch kann die Zelldichte bestimmt und anschließend quantifiziert werden. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen, die verbleibende Flüssigkeit gründlich entfernt und der Boden der Kulturschalen mit Kristallviolettlösung bedeckt. Nach einer Stunde wurde der überschüssige Farbstoff mit Wasser abgewaschen und die gefärbten Kulturschalen für einige Stunden getrocknet.

5.2.10 Färbung von seneszenten Zellen (saure β -Galaktosidase)

In seneszenten Zellen akkumuliert das Enzym β -Galaktosidase, welches die Hydrolyse von β -Galaktosiden in Monosaccharide katalysiert. Dieses Phänomen nutzt man in der seneszenz-assoziierten β -Gal-Färbung aus, indem X-Gal als chromogenes Substrat zur Verfügung gestellt wird, das nach Spaltung durch die β -Galaktosidase eine blaue Färbung erzeugt. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen in PBS gewaschen und durch eine 0,5 %ige Glutarialdehydlösung (in PBS, pH 7,2) für 10 Minuten bei Raumtemperatur

fixiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 mM MgCl₂ (in PBS, pH 7,2) gewaschen und mit der Färbelösung bei 37 °C inkubiert, bis eine Blaufärbung eintrat. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und unter einer Stereolupe ausgewertet und fotografiert.

5.3 Proteinbiochemische Methoden

5.3.1 Bakterielle Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Das zu exprimierende Protein wurde als GST-Fusionsprotein in den pGEX4T3 Vektor kloniert, der eine bakterielle Expression in *Escherichia coli* des Stammes BL21 ermöglicht. Eine klonale Übernachtskultur von 12,5 ml wurde am darauf folgenden Tag 1:20 verdünnt und für etwa 3 Stunden bei 25 °C schüttelnd kultiviert. Bei einer optischen Dichte, d. h. einer Absorption im Spektralphotometer bei 600 nm, von 0,5 bis 2 wurde die bakterielle Expression durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) für 4 Stunden bei 25 °C induziert. Die Bakterien wurden anschließend pelletiert (7.700 x g, 10 min, 4 °C) und zur Aufreinigung in eiskaltem PBS resuspendiert. Um eine Proteindegradation zu verhindern, wurde dem PBS und allen weiteren Puffern Proteaseinhibitoren zugesetzt und auf Eis gearbeitet. Die Bakteriensuspension wurde mit Hilfe eines Ultraschallgerätes sonifiziert (90 x 0,5 Sekunden, jeweils 0,5 Sekunden Pause, 30 % Amplitude), um die Bakterienwände mechanisch zu zerstören. Dieser Suspension wurde Triton X-100 in der Endkonzentration von 1 % zugesetzt und 30 Minuten bei 4 °C gemischt. Die Proteinsuspension wurde durch Zentrifugation (10.000 x g, 10 min, 4 °C) von unlöslichen Fragmenten und Bakterienbestandteilen getrennt und der lösliche Überstand zur weiteren Aufreinigung verwendet.

Für die Aufreinigung des GST-Fusionsproteins wurden Glutathion-Sepharose-*Beads* (GE Healthcare) verwendet. Diese mussten zunächst durch dreifaches Waschen mit kaltem PBS von Ethanolrückständen befreit werden (dazwischen Zentrifugation: 500 x g, 5 min, 4 °C). Die *Beads* wurden anschließend dem Bakteriensonikat zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur rotierend gemischt. Bei diesem Schritt erfolgte die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Glutathion-Sepharose-*Beads*. Die *Beads* wurden sedimentiert (500 x g, 5 min, 4 °C) und dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Die GST-Fusionsproteine wurden in GST-Elutionspuffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Rotieren eluiert.

Das Gemisch wurde zentrifugiert (500 x g, 5 min, Raumtemperatur) und die Elution zweimal wiederholt. Alle drei Eluate wurden gemischt und die Qualität sowie Quantität mittels SDS-PAGE (Abschnitt 5.3.4) und Coomassie-Färbung (Abschnitt 5.3.5) bestimmt.

5.3.2 Herstellung von Gesamtzellproteinlysaten

Für die Proteinisolation wurde das Medium von der Zellkulturschale entfernt, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS abgeschabt. Die Zellen wurden pelletiert (400 x g, 5 min, 4 °C), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Zur weiteren Verarbeitung wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut und anschließend in kaltem RIPA-Lysepuffer resuspendiert. Dem Lysepuffer wurden Proteaseinhibitoren (Sigma) und bei Analyse von Phosphorylierung außerdem Phosphataseinhibitoren (Sigma) zugesetzt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben gründlich gemischt, weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (18.000 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, die Proteinkonzentration bestimmt (Abschnitt 5.3.3) und direkt für die weitere Analyse eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

5.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Messung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford verwendet (Bradford, 1976). In einer Halbmikroküvette wurden 100 µl einer 150 mM NaCl-Lösung vorgelegt, 1 µl der Probe hinzupipettiert und der Ansatz nach Zugabe von 900 µl Bradfordlösung gut gemischt. Nach einer fünfminütigen Inkubation erfolgte die Absorptionsmessung bei 595 nm nach Abgleich mit einem Ansatz mit 1 µl des reinen Lysepuffers. Die erhaltenen Werte wurden mit einer Eichgerade verglichen und so die Proteinkonzentration berechnet.

5.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde die sogenannte diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet (Laemmli, 1970). Dazu wurden 10 bis 40 µg Proteinlysate (Abschnitt 5.3.2) oder das Eluat einer Immunpräzipitation eingesetzt. Proteinlysate wurden zunächst mit Lysepuffer auf ein einheitliches Volumen aufgefüllt und mit der Hälfte ihres Volumens an 3xSDS-Probenpuffer gemischt. Die

Proben wurden 5 Minuten bei 95 °C inkubiert, abzentrifugiert und in die Geltaschen eines SDS-Polyacrylamid-Gels gefüllt. Das Gel bestand aus einem 10 bis 15 %igem Trenngel und einem 4 %igen Sammelgel. Zum Größenvergleich wurden 3 µl eines Größenstandards (PageRuler Pre-Stained Protein Ladder, Fermentas) aufgetragen. Die Proteinproben wurden in der SDS-PAGE-Apparatur (Bio-Rad) mit SDS-Laufpuffer für 30 Minuten bei 80 V und anschließend etwa 90 Minuten bei 120 V aufgetrennt.

5.3.5 Nachweis von Proteinen im Polyacrylamid-Gel durch Coomassie-Färbung

Zur Qualitäts- und Quantitätsprüfung von GST-Fusionsproteinen nach einer bakteriellen Expression oder zum Vergleich eingesetzter Substratmengen für einen Kinase Assay wurde das Polyacrylamid-Gel in die Coomassie-Färbelösung gegeben und für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur geschwenkt. Um den überschüssigen Farbstoff wieder zu entfernen, wurde das Gel mehrmals mit frischer Entfärbelösung inkubiert und anschließend zur längerfristigen Aufbewahrung getrocknet.

5.3.6 Western Blot

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-PAGE (Abschnitt 5.3.4). Anschließend wurden die Proteine durch das Tank-Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert und dort immobilisiert. Die auf die Größe des Gels zugeschnittene Membran wurde eine Minute in Methanol und 2 Minuten in aqua bidest. inkubiert und dann mit dem Gel in Tankblot-Puffer äquilibriert. Das Gel wurde auf die Membran gelegt und beides zwischen Whatman-Filterpapieren in einer Mini-Nassblot-Apparatur (Harnischmacher) eingespannt. Der Proteintransfer erfolgte bei 250 mA für 3 Stunden. Nach dem Transfer wurde die Membran für mindestens 30 Minuten in Blockierungslösung (5 % Magermilchpulver (w/v) in TBS-T) geschwenkt. Die Membran wurde in einer entsprechenden Verdünnung des Primärantikörpers in Blockierlösung über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Nur bei phosphospezifischen Antikörpern wurde anstelle von Magermilch 5 % (w/v) bovines Serumalbumin in TBS-T verwendet. Die Membran wurde für dreimal 10 Minuten in TBS-T gewaschen, mit Sekundärantikörper (1:5000 in Blockierungslösung) für 3 Stunden bei 4 °C oder eine Stunde bei Raumtemperatur rotierend inkubiert und erneut dreimal mit TBS-T gewaschen. Die Detektion der Proteine wurde durch Chemilumineszenz mit dem

ECL+ Western Blot System (Amersham) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden entweder Röntgenfilme exponiert oder die Chemilumineszenz mit Hilfe des LAS-4000 (Fujifilm Global) visualisiert.

Eine Quantifizierung der Western Blot-Ergebnisse erfolgte mittels des Programms ImageJ oder mit Hilfe der Software MultiGauge (Fujifilm Global).

5.3.7 Strippen von PVDF-Membranen

Um gebundene Antikörper wieder von einer PVDF-Membran zu entfernen, damit ein anderes Protein detektiert werden kann, wurde die trockene Membran kurz in Methanol geschwenkt, für 5 Minuten in aqua bidest. gewaschen und dann für 30 Minuten im 60 °C-Wasserbad in Stripping-Puffer inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und erneut in Blockierlösung inkubiert. Die Antikörperinkubation und -detektion erfolgte wie in Abschnitt 5.3.6 beschrieben.

5.3.8 Bestimmung der Proteinhalbwertszeit

Um die Halbwertszeit eines Proteins zu bestimmen, wurden die Zellen mit 100 µg/ml Cycloheximid inkubiert und in regelmäßigen Zeitabständen für die Proteinextraktion mit anschließendem Western Blot geerntet.

5.3.9 Radioaktive Analyse der Kinaseaktivität *in vitro*

Die Bestimmung der Kinaseaktivität wurde *in vitro* mit rekombinanter aktiver Kinase (Akt1, Upstate) und GST-gekoppeltem Substrat durchgeführt. Als Positivkontrolle diente GST-FoxO3a-Gesamtlänge und GST-FoxO3a 1-915. Diese und die GST-Fbw7α-Varianten (Wildtyp und S227A-Mutante) wurden, wie in Abschnitt 5.3.1 beschrieben, bakteriell exprimiert und mittels GST-*Beads* aufgereinigt. Die unten stehenden Reagenzien wurden in einem Reaktionsgefäß gemischt und anschließend bei 30 °C für 30 Minuten inkubiert.

Reaktionsansatz: 100 ng aktive Kinase
 1 µg Substrat

10 μCi ^{32}P - γ -ATP

50 μM ATP

ad 25 μl Kinase-Puffer

(mit Protease- und Phosphataseinhibitoren)

Anschließend wurden 10 μl 3x SDS-Probenpuffer zugegeben, die Proben 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und mittels SDS-PAGE (Abschnitt 5.3.4) aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und die Phosphorylierung des Substrats durch Autoradiografie detektiert. Dazu wurde ein Röntgenfilm für 2 bis 24 Stunden bei -80 °C exponiert.

5.3.10 Immunpräzipitation

Zur Aufreinigung von Proteinen und zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurde eine Immunpräzipitation (IP) durchgeführt. Dabei wird das Protein mit Hilfe eines Antikörpers über Sepharose-*Beads* isoliert. Die Zellen wurden dafür in TNT-Lysepuffer (mit Protease- und Phosphataseinhibitoren) lysiert (Abschnitt 5.3.2) und ein Teil des Lysates als Input abgenommen. Zum Lysat wurden in Lysepuffer gewaschene Protein A oder G Sepharose-*Beads* und der entsprechende Antikörper gegeben und für 3 Stunden rotierend bei 4 °C inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen und die *Beads* dreimal mit Lysepuffer gewaschen. Danach wurden die *Beads* in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Durch ein fünfminütiges Aufkochen bei 95 °C wurden die präzipitierten Proteine von den *Beads* gelöst, durch eine SDS-PAGE (Abschnitt 5.3.4) der Größe nach aufgetrennt und im Western Blot detektiert.

5.3.11 Denaturierende Immunpräzipitation

Bei der denaturierenden Immunpräzipitation sind die Bedingungen so gewählt, dass keine Protein-Protein-Interaktionen mehr möglich sind, sodass außer dem Protein, gegen das der verwendete Antikörper gerichtet ist, keine weiteren Proteine kopräzipitiert werden. Dafür wird das Zellpellet in gleichen Volumina PBS und denaturierendem Lysepuffer resuspendiert und für 5 Minuten bei 95 °C aufgekocht. Danach wird die Zellsuspension durch Zugabe von TNT-Lysepuffer 10-fach verdünnt und abzentrifugiert. Der Überstand wird dann für die Immunpräzipitation verwendet (Abschnitt 5.3.10).

5.3.12 *In vivo* Ubiquitinierungsuntersuchung

Zum Nachweis der Ubiquitinierung *in vivo* wurden die Zellen zunächst mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert (His₆-Ubiquitin, FLAG-Fbw7 als E3-Ligase und Myc oder Zyklin E als Substrat). 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 5 Minuten mit 1 mM NEM (N-Ethylmaleimid) behandelt, um Cysteinproteasen zu hemmen. Die meisten deubiquitinierenden Enzyme sind Cysteinproteasen, somit kann die Deubiquitinierung verhindert werden. Die Zellen wurden geerntet und lysiert, ein Teil des Lysats als Input abgenommen und die mit His₆-markierten Proteine durch Nickel-NTA-*Beads* aufgereinigt. Die ubiquitinierten Proteine konnten dann im Western Blot nachgewiesen werden.

5.3.13 Indirekte Immunfluoreszenz

Um die subzelluläre Lokalisation bestimmter Proteine mittels indirekter Immunfluoreszenz zu untersuchen, wurden die Zellen auf Glasdeckgläschen kultiviert. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Durch eine 4 %ige Paraformaldehydlösung wurden die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für zweimal 10 Minuten in 0,1 M Glycin in PBS und für 5 Minuten in 0,1 % NP40 in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen in eine feuchte Kammer überführt, für 45 Minuten in Blockierlösung und für 1,5 Stunden in einer entsprechenden Verdünnung des Primärantikörpers in Blockierlösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Blockierlösung erfolgte die Färbung mit dem fluoreszenzmarkierten (Alexa488) Sekundärantikörper (1:400 in Blockierlösung) und parallel die DNA-Färbung mit Hoechst (1:10.000 in Blockierlösung) für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit 0,1 % NP40 in PBS und jeweils einmal mit PBS bzw. aqua bidest. gewaschen. Zum Eindecken der Proben wurde ein kleiner Tropfen Mowiol auf einen Objektträger gegeben und die Deckgläschen kopfüber luftblasenfrei aufgelegt. Zum Abdichten der Deckgläschen wurden die Ränder mit klarem Nagellack versiegelt. Die Objektträger wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

5.4 Tierexperimentelle Methoden

5.4.1 Zucht von Mäusen

Die Maushaltung erfolgte bei einer Raumtemperatur von 20 °C in einem künstlichen Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 Stunden. Ab einem Alter von 6 Wochen konnten Männchen und Weibchen verpaart werden. Die Nachkommen wurden im Alter von drei bis vier Wochen durch eine Ohrmarke gekennzeichnet und über ein Stück Schwanzgewebe genotypisiert. In diesem Alter wurden die Tiere auch von ihren Eltern getrennt und nach Geschlecht in separate Käfige aufgeteilt.

5.4.2 Entnahme von Mausembryonen und Isolierung von murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs)

Für die Gewinnung von MEFs wurden Embryonen am Entwicklungstag 13,5 verwendet. Das schwangere Weibchen wurde mit Isofluran, einem Inhalationsanästhetikum (Baxter), betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Nach einer äußerlichen Desinfektion mit 70 %igem Ethanol wurde der Bauchraum geöffnet, der Uterus herauspräpariert und in eine mit PBS gefüllte Petrischale gelegt. Alle weiteren Schritte wurden unter einer sterilen Zellkulturwerkbank durchgeführt. Der Uterus wurde vorsichtig geöffnet und ein Embryo nach dem anderen herausgenommen und weiterverarbeitet. Mit Hilfe eines Skalpells wurde der Kopf des Embryos abgetrennt, in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Genotypisierung bei -80 °C gelagert. Die roten, blutbildenden Organe aus dem Bauchraum des Embryos wurden mit einer Pinzette entfernt. Der Rest des Embryos wurde in einer frischen, trockenen Petrischale in sehr kleine Stücke geschnitten, in PBS aufgenommen und in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nachdem sich die Gewebestücke abgesetzt hatten, wurde das PBS vorsichtig abgesaugt und nochmals frisches PBS dazugegeben und wiederum nach Absetzen der Gewebestücke vorsichtig entfernt. Danach wurden die Stücke für 30 Minuten bei 37 °C mit 1 ml Trypsinlösung inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Reaktionsgefäße mehrmals leicht geschüttelt, um die Suspension zu durchmischen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 9 ml MEF-Medium abgestoppt, die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt und auf eine 10 cm-Schale überführt. Nach 24 Stunden konnten

die Zellen jeder 10 cm-Schale auf eine 15 cm-Schale expandiert werden und nach Erreichen der Konfluenz gegebenenfalls eingefroren werden.

5.4.3 Intraperitoneale Injektion von Mäusen

Zur Aktivierung der Cre-Rekombinase bei Rosa26-CreER^{T2}-Mäusen wurde ca. 8 Wochen alten Tieren an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 1 mg Tamoxifen (gelöst in Erdnussöl, beides Sigma) intraperitoneal injiziert.

5.4.4 Organentnahme bei Mäusen

Zur Entnahme von Organen wurde die Maus mit Isofluran anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet. Nach einer äußerlichen Desinfektion mit 70 %igem Ethanol wurde der Bauchraum sowie der Brustkorb mit einer Schere geöffnet. Die entnommenen Organe wurden zunächst in eine Petrischale mit kaltem PBS gelegt und in Stücke zerschnitten. Diese wurden entsprechend ihrem Verwendungszweck weiterverarbeitet.

5.4.5 Isolierung von B-Zellen

Um B-Zellen aus entnommenen B-Zell-Lymphomen (Lymphknoten oder Milz) zu isolieren, wurde das entsprechende Gewebe zunächst mit einem Skalpell zerkleinert und mit der Rückseite eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µM, BD Bioscience) in eine Petrischale mit PBS gedrückt um das Gewebe mechanisch zu homogenisieren. Die Zellsuspension wurde durch ein frisches Zellsieb in ein 50 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation (400 x g) wurde das Pellet in 10 ml ACK-Lysepuffer resuspendiert, um die im Gewebe enthaltenen Erythrozyten zu entfernen. Nach drei Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 40 ml PBS abgestoppt und die Zellen erneut für fünf Minuten bei 400 x g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes konnten die Zellen ihrem Verwendungszweck zugeführt werden (Inkulturnahme, Protein, RNA, genomische DNA, Durchflusszytometrie).

6 Ergebnisse

6.1 Die Regulation von Fbw7 durch PI3K-abhängige Phosphorylierung

6.1.1 Serin 227 in Fbw7 wird PI3K-abhängig phosphoryliert

Ziel dieses Projektes war es herauszufinden, ob es neben der Phosphorylierung der Fbw7-Substratproteine weitere Mechanismen gibt, die den Abbau von Fbw7-Substraten regulieren. Dazu wurde die Aminosäuresequenz von Fbw7 mit Hilfe des bioinformatischen Programms Scansite (<http://scansite.mit.edu/>) untersucht. Dieses Programm sucht in Proteinsequenzen nach Zielmotiven für bestimmte Proteinkinasen. In Fbw7 wurde die Aminosäuresequenz um Serin 227 als Konsensussequenz für die Akt/PKB-Kinase angegeben. Serin 227 befindet sich drei Aminosäuren amino-terminal vor der Dimerisierungsdomäne. Diese Region kommt in allen drei Fbw7-Isoformen vor und ist evolutionär vom Zebrafisch bis zum Menschen konserviert (Abb. 6A).

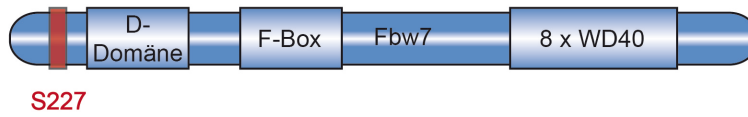
Zuerst sollte überprüft werden, ob Serin 227 in Fbw7 *in vivo* phosphoryliert wird. Dafür wurde FLAG-Fbw7 in HeLa-Zellen transient überexprimiert und eine Immunpräzipitation mit FLAG-Antikörper durchgeführt. Im Western Blot wurde neben dem FLAG-Antikörper mit dem die Effizienz der Immunpräzipitation überprüft wurde, auch ein phospho-Akt-Substrat-Antikörper verwendet. Dieser erkennt ein Serin oder Threonin in der Akt-Konsensussequenz (**RxRxxS/T**) nur in der phosphorylierten Form. Mit diesem Antikörper konnte gezeigt werden, dass Wildtyp-Fbw7 eine phosphorylierte Akt-Konsensussequenz enthält. Außerdem wurde eine ebenfalls FLAG-markierte Punktmutante von Fbw7 verwendet, in der Serin 227 zu einem nicht-phosphorylierbaren Alanin mutiert wurde (S227A). In Zellen, die diese Punktmutante exprimieren, konnte kein phospho-Akt-Substrat-Signal nachgewiesen werden, woraus geschlossen werden kann, dass Serin 227 in Fbw7 *in vivo* phosphoryliert wird (Abb. 6B). Die Zellyse erfolgte in diesen Experimenten unter denaturierenden Bedingungen, sodass sichergestellt ist, dass das phospho-Akt-Substrat-Signal wirklich von Fbw7 und nicht von einem interagierenden, kopräzipitierten Protein hervorgerufen wird. Zur Kontrolle wurde dieses Experiment auch mit einer S182A-Mutante von Fbw7 durchgeführt. Dieses Serin liegt nicht in einer optimalen

Konsensussequenz für Akt und die Mutation hatte keinen Einfluss auf das phospho-Akt-Substrat-Signal (Daten nicht gezeigt).

Bestätigt wurde das Ergebnis durch ein Experiment mit umgekehrter Antikörper-Verwendung (Immunpräzipitation mit dem phospho-Akt-Substrat-Antikörper und Western Blot mit dem FLAG-Antikörper). Auch hier konnte ein Signal für Wildtyp-Fbw7 detektiert werden, jedoch nicht mit der S227A-Mutante (Abb. 6C, Spur 1 und 3).

Die Sequenz um Serin 227 entspricht nicht nur der Konsensussequenz für die Akt/PKB-Kinase, sondern auch für die anderen Serin/Threonin-Kinasen der AGC-Familie (benannt nach den Proteinkinase-Familien A, G und C, deren katalytische Kinasedomänen eine hohe Sequenzhomologie aufweisen) (zusammengefasst in (Pearce et al., 2010)). Allen diesen Kinasen ist gemeinsam, dass sie von PI3K aktiviert werden. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Hemmung von PI3K die Phosphorylierung von Fbw7 an Serin 227 blockieren kann. Dafür wurden HeLa-Zellen, die Fbw7-Wildtyp oder die S227A-Mutante transient überexprimieren, mit LY290024 oder BEZ235 behandelt. Bei diesen Substanzen handelt es sich um gut charakterisierte Inhibitoren der PI3-Kinase (Maira et al., 2008; Vlahos et al., 1994). Eine vierstündige Behandlung mit jedem der beiden Inhibitoren führte zu einer Reduktion der Phosphorylierung, während eine 24-stündige Behandlung die Phosphorylierung komplett hemmen konnte (Abb. 6C, Spur 2 und 4, Abb. 6D). Somit konnte gezeigt werden, dass Signalwege unterhalb der PI3-Kinase für die Phosphorylierung von Serin 227 in Fbw7 essentiell sind.

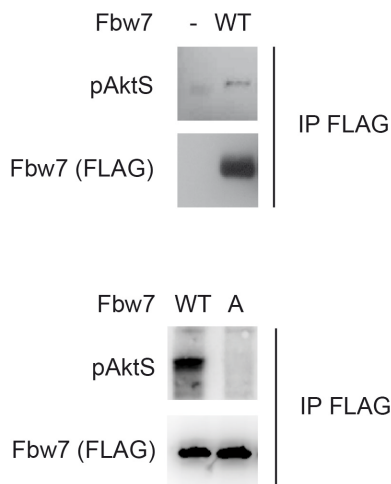
A.



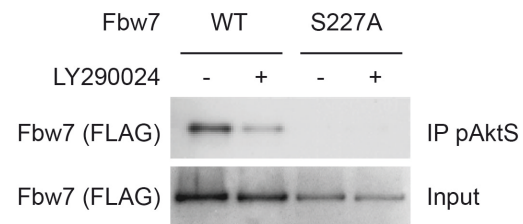
Akt Konsensus			RXRXS/T
Fbw7	H.s.	222	RRRITSVQPPT..
	M.m.	143	RRRITSVQPPT..
	B.t.	142	RRROTSVQPPT..
	X.l.	221	RRRITSVQPPT..
	D.r.	58	RRRITSIQPPT..

Start der Dimerisierungs-Domäne

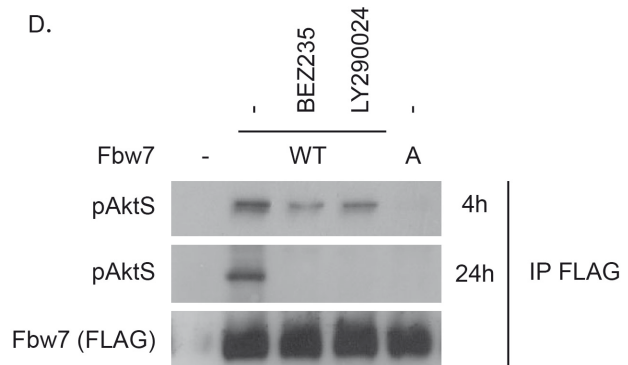
B.



C.



D.



freundlicherweise zur Verfügung gestellt
von Nikita Popov

Abb. 6: Fbw7 wird PI3K-abhängig an Serin 227 phosphoryliert¹

(A) Fbw7 enthält eine Akt-Konsensussequenz. Oben: Schematische Darstellung der Lokalisierung von Serin 227 im humanen Fbw7 α relativ zu anderen funktionalen Domänen. Unten: Der Vergleich der

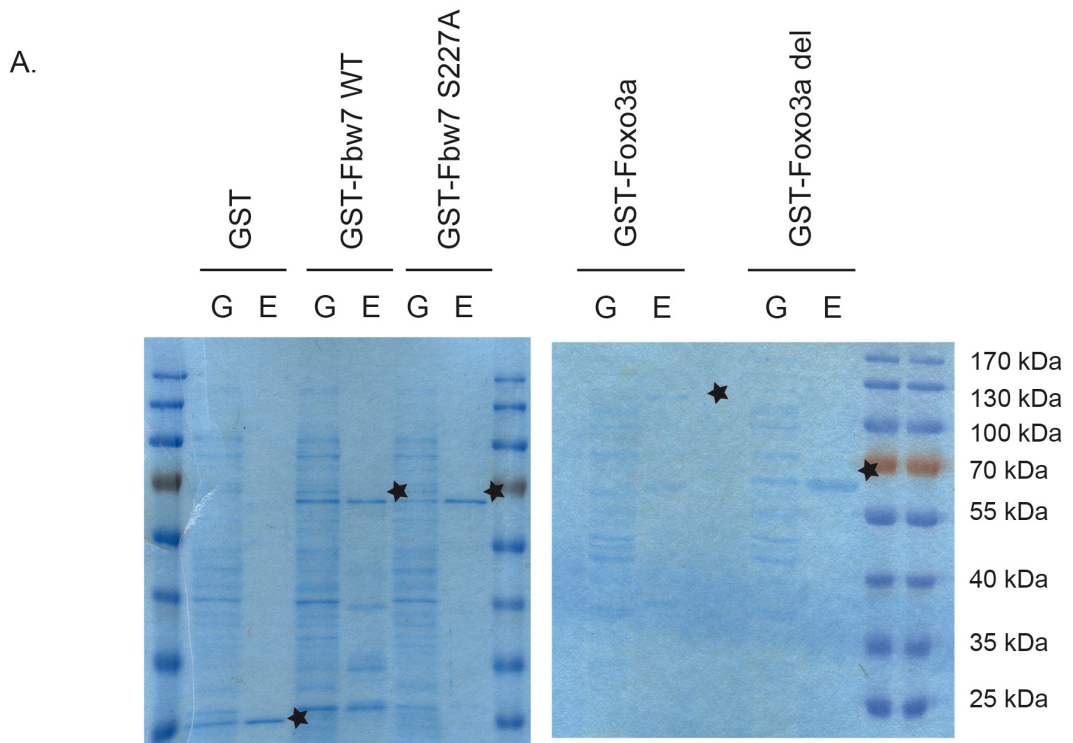
¹ diese Abbildung wurde in ähnlicher Form veröffentlicht in Schülein, C., and Eilers, M., Popov, N. (2011). PI3K-dependent phosphorylation of Fbw7 modulates substrate degradation and activity. FEBS Lett 585, 2151-2157.

Akt-Konsensussequenz mit dem Ser 227-Motiv in der Fbw7-Sequenz verschiedener Spezies zeigt die evolutionäre Konservierung dieses Bereichs. (H.s.: Homo sapiens, M.m.: Mus musculus, B.t.: Bos taurus, X.l.: Xenopus laevis, D.r.: Danio rerio)

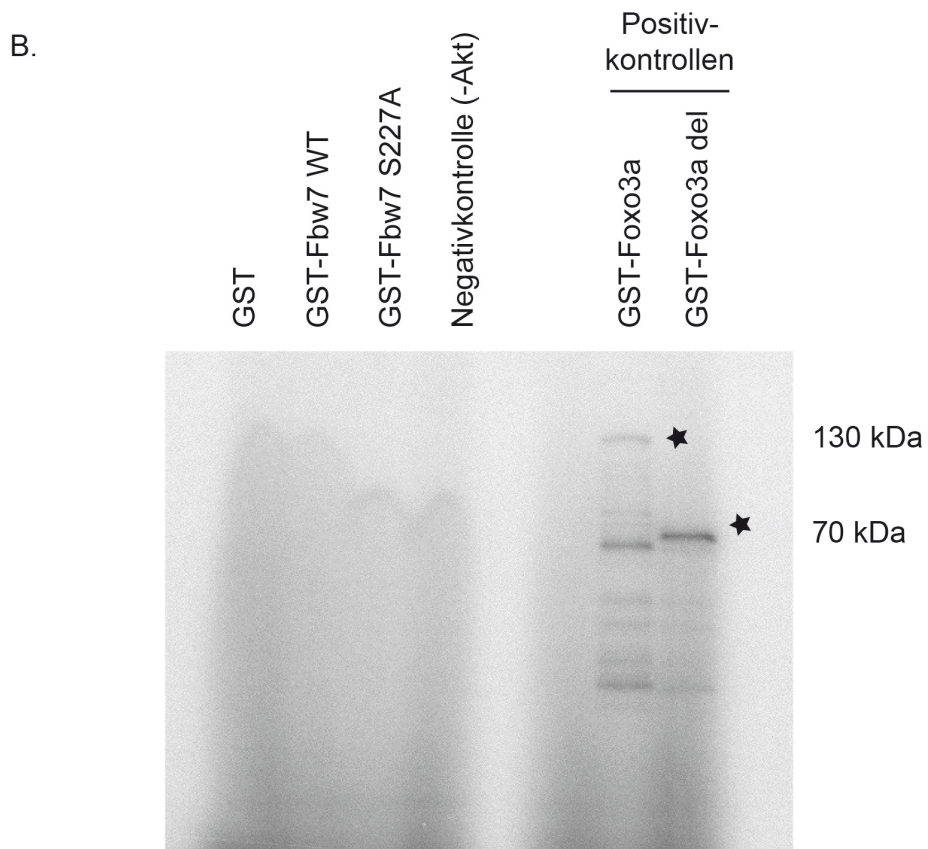
- (B) Fbw7 ist ein phosphoryliertes Akt-Substrat. HeLa-Zellen wurden mit FLAG-Fbw7 transfiziert (WT: Wildtyp, A: S227A). Die Zellen wurden unter denaturierenden Bedingungen lysiert und eine Immunpräzipitation mit FLAG-Antikörper durchgeführt. Die Präzipitate wurden im Western Blot mit FLAG- und phospho-Akt-Substrat-Antikörper (pAktS) analysiert.
- (C) Die Phosphorylierung von Ser 227 in Fbw7 ist abhängig vom PI3K-Signalweg. Das Experiment wurde durchgeführt wie in 6B; vor der Lyse wurden die Zellen für vier Stunden mit 50 μ M LY290024 behandelt. Die Immunpräzipitation wurde mit dem phospho-Akt-Substrat-Antikörper durchgeführt, der Western Blot mit FLAG-Antikörper.
- (D) Das Experiment wurde durchgeführt wie in 6B und C; vor der Lyse wurden die Zellen für vier bzw. 24 Stunden mit BEZ235 oder LY290024 behandelt. Die Immunpräzipitation wurde mit FLAG-Antikörper durchgeführt, der Western Blot mit dem phospho-Akt-Substrat-Antikörper.

6.1.2 Akt phosphoryliert Fbw7 α nicht *in vitro*

Da es sich bei der Sequenz um Serin 227 um eine Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch die Serin/Threonin-Kinase Akt/PKB handelt, wurde untersucht, ob Akt Fbw7 α direkt phosphorylieren kann. Dafür wurden Phosphorylierungsversuche *in vitro* mit rekombinanter, aktiver Akt1-Kinase durchgeführt. Als Substrat diente bakteriell exprimiertes und aufgereinigtes GST-Fbw7 α -Fusionsprotein, sowohl in der Wildtyp-Form als auch als S227A-Punktmutante. Allerdings wurde nicht das Gesamtlängenprotein von Fbw7 verwendet, sondern eine Deletionsmutante, die nur die amino-terminalen 250 Aminosäuren enthält, um eine effiziente Expression und Aufreinigung zu gewährleisten. Als Positivkontrolle diente das FoxO3a-Protein (Wildtyp und eine Deletionsmutante, die nur die Aminosäuren 1 bis 915 enthält), das bereits als Substrat der Kinase Akt beschrieben wurde (Brunet et al., 1999). Reines GST wurde verwendet, um unspezifische Phosphorylierungen erkennen zu können. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit Fbw7 α -WT als Substrat, dem keine Akt-Kinase zugesetzt wurde. Die eingesetzte Menge an Substratproteinen wurde durch eine Coomassie-Färbung visualisiert (Abb. 7A). Akt1 phosphorylierte sowohl FoxO3a-Wildtyp als auch die FoxO3a-Deletionsmutante. Allerdings konnte bei Fbw7 kein Phosphorylierungssignal nachgewiesen werden (Abb. 7B). Aus diesem Experiment konnte geschlossen werden, dass nicht Akt1 selbst die Kinase ist, die Ser 227 in Fbw7 phosphoryliert, sondern vermutlich eine andere Kinase der AGC-Familie, die alle dieselbe Konsensussequenz erkennen und von PI3K reguliert werden.



Coomassie-Färbung



Autoradiogramm

Abb. 7: Akt phosphoryliert Fbw7 nicht *in vitro*

- (A) Coomassie-Färbung der im Kinase Assay eingesetzten GST-Fusionsproteine. G = Gesamtlysat nach IPTG-Induktion, E = Eluat nach Aufreinigung. Das Sternchen markiert jeweils das aufgereinigte GST oder GST-Fusionsprotein.
- (B) Akt1 phosphoryliert GST-Fbw7 α nicht im *in vitro*-Kinase Assay. Die bakteriell exprimierte und aufgereinigte GST-Fusionsproteine wurden mit rekombinant aktiver Akt1-Kinase unter Zugabe von γ -³²P-ATP inkubiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und die Phosphorylierung durch Autoradiographie nachgewiesen. GST und ein Probenansatz ohne Akt1 dienen als Negativkontrollen, die beiden FoxO3a-Konstrukte dienen als Positivkontrollen. Die Sternchen markieren das jeweilige GST-FoxO3a-Fusionsprotein.

6.1.3 Die Phosphorylierung von Serin 227 in Fbw7 beeinflusst sowohl die Stabilität von Fbw7-Substraten als auch von Fbw7 selbst

Zur Analyse der physiologischen Rolle der Serin 227-Phosphorylierung wurde in HeLa-Zellen entweder Myc oder Zyklin E mit einem Myc-Tag allein oder zusammen mit FLAG-Fbw7-Wildtyp bzw. FLAG-Fbw7-S227A transient überexprimiert. Die Koexpression von Fbw7-Wildtyp führt zu einer starken Reduktion der Proteinmenge von Myc und Zyklin E, wohingegen die Koexpression der S227A-Mutante nur zu einer minimalen Reduktion führt (Abb. 8A), was darauf hindeutet, dass die Phosphorylierung von Serin 227 notwendig ist, damit Fbw7 voll funktionsfähig ist.

Ein gutes System, um den Effekt der Serin 227-Phosphorylierung auf endogene Fbw7-Substrate zu untersuchen, stellen Fbw7-defiziente HCT116-Zellen dar (Rajagopalan et al., 2004). Sie haben den Vorteil, dass die Effekte einer exogen exprimierten Fbw7-Mutante ohne den Hintergrund von Wildtyp-Protein oder anderen Fbw7-Isoformen untersucht werden können. Die Zellen wurden mit Retroviren transduziert, die für FLAG-Fbw7-Wildtyp bzw. -S227A codieren. Nach Selektion erfolgreich transduzierter Zellen wurden die Proteinmengen von verschiedenen bekannten Fbw7-Substraten im Western Blot analysiert. Im Vergleich zu Fbw7-profizienten Zellen enthielten die nur mit einem Leervektor transduzierten Fbw7-defizienten Zellen erhöhte Mengen an Myc und Zyklin E; die Expression von Fbw7-Wildtyp konnte diesen Effekt wieder umkehren, was konsistent mit bereits veröffentlichten Beobachtungen ist (Grim et al., 2008). Allerdings war die S227A-Mutante wiederum in ihrer Fähigkeit eingeschränkt, die Myc- und Zyklin E-Proteinmengen in dem Maße zu senken wie das Wildtyp-Fbw7-Protein. Die Proteinmengen weiterer bekannter Fbw7-Substrate (SREBP1, mTOR und Mcl1) unterschieden sich nicht zwischen Fbw7-defizienten und -profizienten Zellen und änderten sich auch

nach Rekonstitution mit Fbw7-Wildtyp oder -Mutante nicht (Abb. 8B) (Inuzuka et al., 2011; Mao et al., 2008; Sundqvist et al., 2005; Wertz et al., 2011).

Prinzipiell könnten die unterschiedlichen Myc- und Zyklin E-Proteinmengen verschiedene Ursachen haben. Da Fbw7 eine Untereinheit einer Ubiquitin-Ligase ist und Proteine für den proteasomalen Abbau markiert, sollte untersucht werden, ob Unterschiede in der Protein-Degradation für die beobachteten Effekte verantwortlich sind. Dafür wurden Cycloheximid-Experimente in den rekonstituierten HCT116-Zellen durchgeführt. Cycloheximid hemmt die Translation und verhindert somit die *de novo*-Proteinsynthese, was die Bestimmung der Abbaugeschwindigkeit von Proteinen erlaubt. Es konnte festgestellt werden, dass Myc und Zyklin E in den mit Fbw7-Wildtyp rekonstituierten Zellen schneller abgebaut wurden als in den mit Leervektor oder Fbw7-S227A transduzierten Zellen. Besonders deutlich ist dieser Effekt für die an Threonin 58-phosphorylierte Fraktion an Myc-Protein, welche die Fraktion darstellt, die von Fbw7 gebunden und abgebaut werden kann. Eine weitere interessante Beobachtung war, dass das Fbw7-S227A-Protein selbst eine deutlich reduzierte Stabilität im Vergleich zum Wildtyp-Protein gezeigt hat (Abb. 8C). Die reduzierte Stabilität könnte also zur geringeren Aktivität gegenüber den Substraten beitragen.

Da Fbw7 seine Substrate durch das Anhängen von Ubiquitinketten zum proteasomalen Abbau markiert, wurde untersucht, ob die Phosphorylierung von Fbw7 an Serin 227 die Fähigkeit zur Ubiquitinierung beeinflusst. Für *in vivo* Ubiquitinierungs-Untersuchungen wurden HeLa-Zellen mit Myc oder Zyklin E zusammen mit FLAG-Fbw7-Wildtyp bzw. -S227A und His₆-Ubiquitin transfiziert. Mit Hilfe von Nickel-NTA-Agarose wurden ubiquitinierte Proteine aufgereinigt und im Western Blot nachgewiesen. Die Expression von Fbw7-Wildtyp führte zu einem Anstieg der Menge an ubiquitiniertem Myc und Zyklin E, was mit einer Reduktion an unmodifiziertem Protein einherging. Die S227A-exprimierenden Zellen zeigten im Vergleich zu Vektor-exprimierenden Zellen kaum einen Anstieg in der Menge an ubiquitiniertem Myc bzw. Zyklin E und dementsprechend auch kaum eine Reduktion an unmodifiziertem Protein (Abb. 8D). Daraus lässt sich schließen, dass die Phosphorylierung von Serin 227 die Fähigkeit von Fbw7 zur Substratubiquitinierung erhöht.

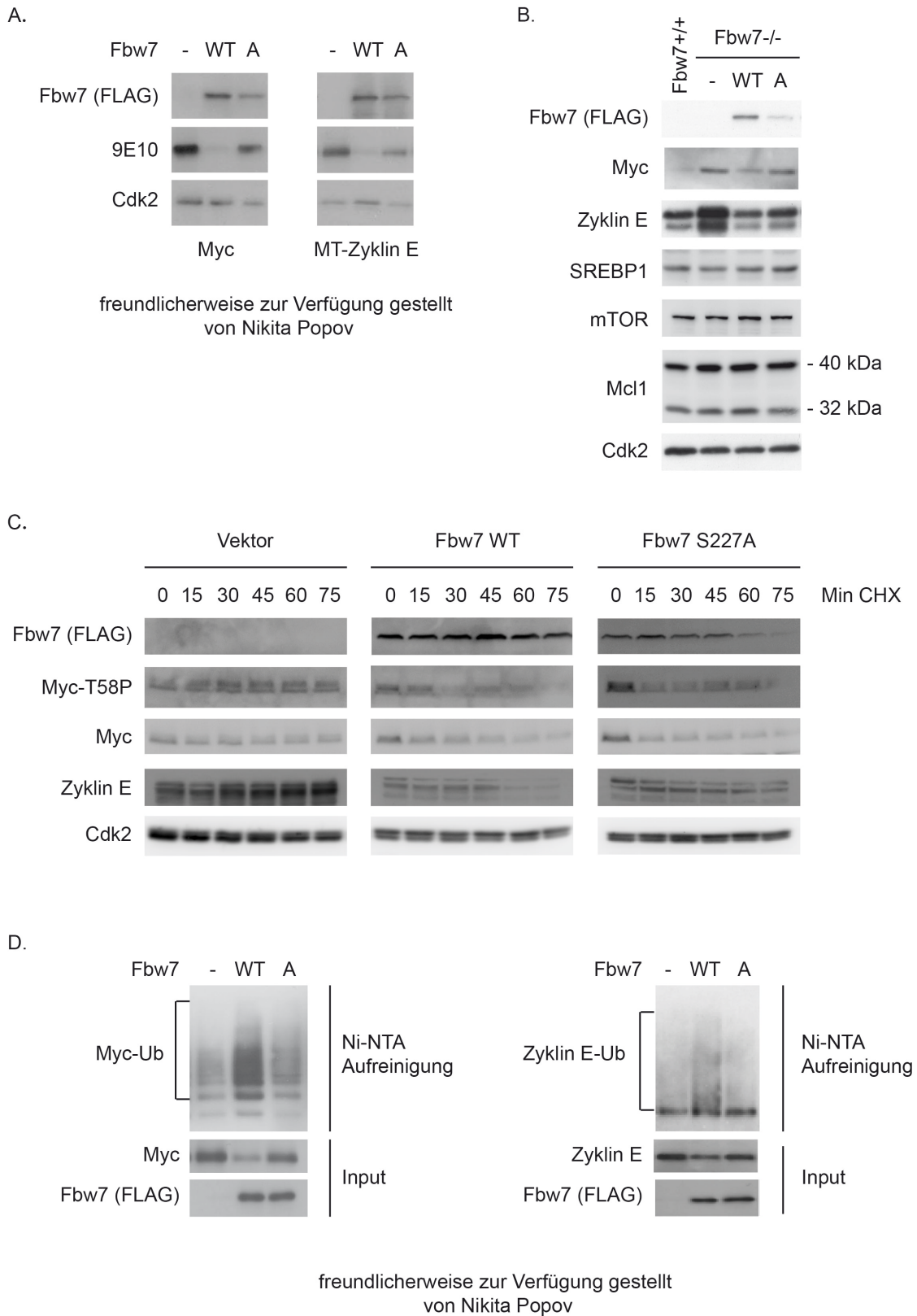


Abb. 8: Die Phosphorylierung von Ser 227 beeinflusst die Stabilität von Fbw7-Substraten und von

Fbw7 selbst²

- (A) Die S227A-Mutante von Fbw7 hat einen schwächeren Einfluss auf Substratproteine als WT-Fbw7. HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für Myc bzw. Zyklin E mit *Myc-Tag* (MT-Zyklin E) und den angegebenen Fbw7-Expressionsplasmiden transfiziert (WT: Wildtyp, A: S227A). 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Proteinexpression von Fbw7 mit FLAG-Antikörper und die von Myc und Zyklin E mit dem 9E10-anti-Myc-Antikörper nachgewiesen. Cdk2 diente als Ladekontrolle.
- (B) Auch in rekonstituierten Fbw7-defizienten Zellen hat die S227A-Mutante einen schwächeren Einfluss auf Myc und Zyklin E als WT-Fbw7. Fbw7-defiziente HCT116-Zellen wurden retroviral mit FLAG-Fbw7-WT bzw. -S227A oder einem Leervektor infiziert. Nach der Selektion wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot auf die Expression verschiedener Proteine untersucht. Parentale, mit Leervektor infizierte HCT116-Zellen wurden parallel als Kontrolle untersucht.
- (C) Die Abbaugeschwindigkeit von Myc, Zyklin E und Fbw7 selbst ist von der Phosphorylierung an Ser 227 abhängig. Fbw7-defiziente HCT116-Zellen wurden retroviral infiziert wie in 8B und mit Cycloheximid (CHX) behandelt, um die Proteinneusynthese zu blockieren und nach den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Zelllysate wurden im Western Blot analysiert.
- (D) Die Fbw7-S227A-Mutante zeigt eine schwächere Ubiquitinierung von Substratproteinen als Fbw7-WT. HeLa-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Myc, Zyklin E, His₆-Ubiquitin und FLAG-Fbw7 transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen zur Hemmung von Deubiquitinasen für 5 Minuten mit 1 mM NEM behandelt, lysiert und eine Nickel-NTA-Aufreinigung durchgeführt, um ubiquitinierte Proteine anzureichern. Mittels Western Blot wurden die angegebenen Proteine nachgewiesen.

6.1.4 Die Phosphorylierung von Serin 227 hat keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation und auf bekannte Interaktionen von Fbw7

Eine mögliche Erklärung für die eingeschränkte Funktion der S227A-Mutante wäre eine veränderte Lokalisation innerhalb der Zelle. Jede der drei Fbw7-Isoformen weist eine andere subzelluläre Lokalisation auf und auch interagierende Proteine können die Lokalisation beeinflussen (Bonetti et al., 2008; Durgan and Parker, 2010; Welcker et al., 2011). Um zu überprüfen, ob sich die S227A-Mutante in ihrer Lokalisation vom Wildtyp-Protein unterscheidet, wurde in HeLa-Zellen FLAG-Fbw7-Wildtyp oder FLAG-Fbw7-S227A transient überexprimiert und das FLAG-Tag mittels indirekter Immunfluoreszenz mit FLAG-Antikörper und einem Alexa488-gekoppelten Sekundäntikörper nachgewiesen. Die Gegenfärbung der DNA und damit der Zellkerne erfolgte mit Hoechst. Es konnte gezeigt werden, dass Fbw7-Wildtyp und Fbw7-S227A im Nucleus lokalisiert sind, was typisch für die alpha-Isoform ist (Abb. 9A).

Des Weiteren sollte bestimmt werden, ob bekannte Interaktionen von Fbw7 von der S227A-Mutation beeinflusst werden. Fbw7 ist eine Untereinheit des SCF-Komplexes, einer aus mehreren Untereinheiten bestehenden Ubiquitin-Ligase. Über die F-Box bindet

² diese Abbildung wurde in ähnlicher Form veröffentlicht in Schüle, C., and Eilers, M., Popov, N. (2011). PI3K-dependent phosphorylation of Fbw7 modulates substrate degradation and activity. *FEBS Lett* 585, 2151-2157.

Fbw7 an Skp1, welches einen Adapter darstellt und die Interaktion mit den weiteren Komponenten des SCF-Komplexes (Cul1 und Rbx1) vermittelt (Cardozo and Pagano, 2004). Sollte die Interaktion zwischen Fbw7-S227A und Skp1 beeinträchtigt sein, würde das eine verminderte Fähigkeit zur Ubiquitinierung und folglich einen verringerten proteasomalen Abbau nach sich ziehen. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurden Immunpräzipitations-Experimente durchgeführt. Sowohl das Wildtyp-Protein als auch die Punktmutante waren in der Lage, Skp1 effizient zu binden. Die verminderte Fähigkeit der S227A-Mutante zur Ubiquitinierung von Substraten kann also nicht mit einer eingeschränkten Skp1-Rekrutierung erklärt werden (Abb. 9B).

Es ist bekannt, dass Fbw7 über die Dimerisierungsdomäne Homodimere bilden kann, wodurch die Effizienz der Substratubiquitinierung erhöht wird. Um zu testen, ob die Phosphorylierung von Serin 227 notwendig für die Homodimerisierung ist, wurden wiederum Immunpräzipitationen durchgeführt. Sowohl Fbw7-Wildtyp, als auch Fbw7-S227A konnten effizient an Fbw7-Wildtyp binden (Abb. 9C), wohingegen eine bekannte dimerisierungsdefiziente Fbw7-Mutante (LI256EE) nicht mit Fbw7-Wildtyp interagieren konnte (Tang et al., 2007). Außerdem konnte durch Immunpräzipitationen gezeigt werden, dass die S227A-Mutation weder die Bindung von Usp28 an Fbw7, noch die Substratbindung von Fbw7 hemmt (Daten nicht gezeigt).

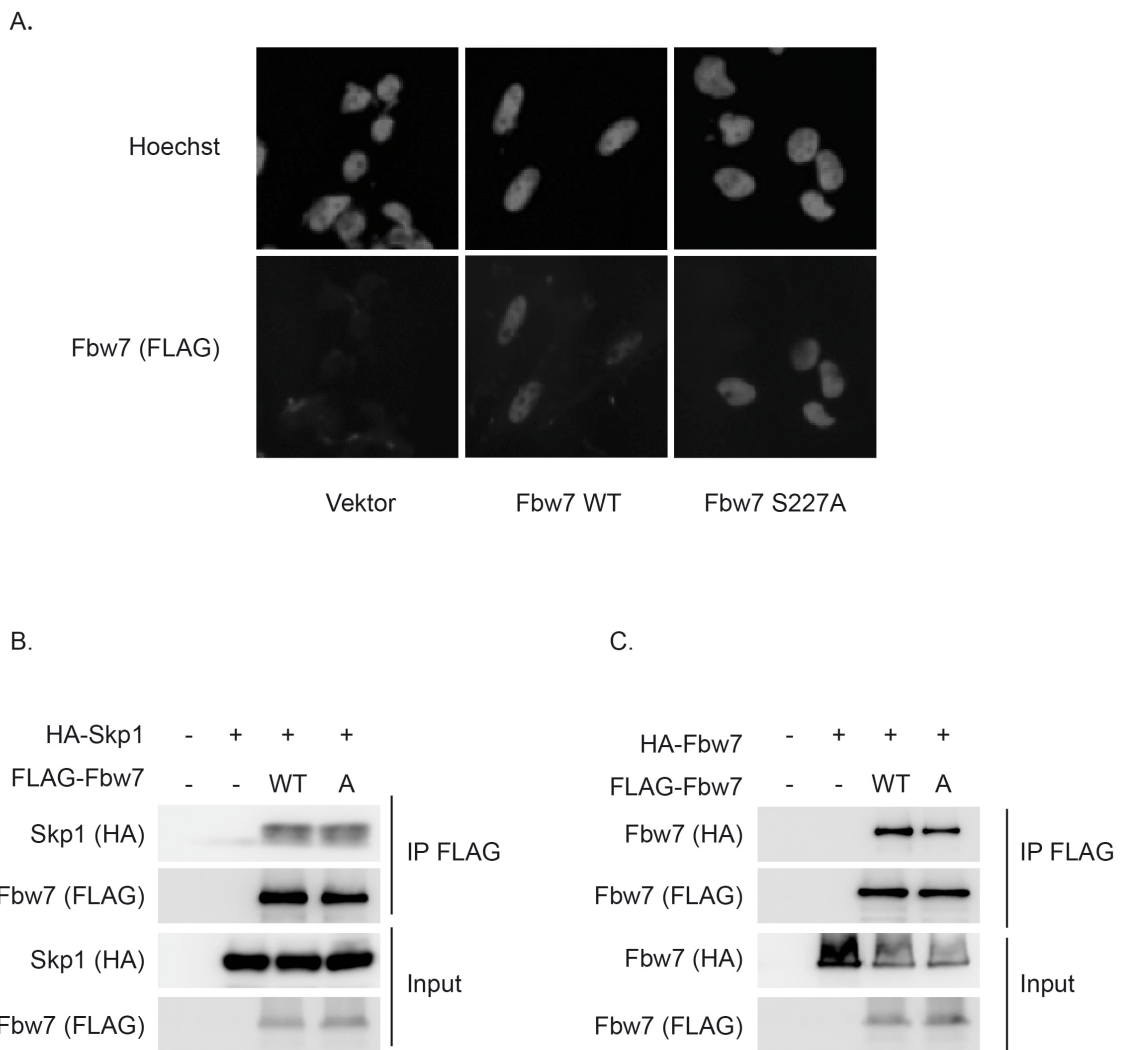


Abb. 9: Die Phosphorylierung von Ser 227 hat keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation und auf bekannte Interaktionen von Fbw7³

- (A) Die Phosphorylierung an Ser 227 hat keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von Fbw7. HeLa-Zellen wurden transient mit FLAG-Fbw7-WT oder -S227A transfiziert. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert und die subzelluläre Lokalisation von Fbw7 durch indirekte Immunfluoreszenz bestimmt. Fbw7 wurde mit dem FLAG-Antikörper nachgewiesen, die DNA zur Kontrolle mit Hoechst gegengefärbt. Die Transfektionseffizienz betrug in diesem Experiment ca. 20 %.
- (B) Die Phosphorylierung an Ser 227 hat keinen Einfluss auf die Interaktion von Fbw7 mit Skp1. HEK293T-Zellen wurden transient mit HA-Skp1 und FLAG-Fbw7-WT oder -227A transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 3 Stunden mit 10 μ M MG-132 behandelt. Nach der Lyse wurde eine Immunpräzipitation mit FLAG-Antikörper durchgeführt und die Präzipitate im Western Blot mit Antikörpern gegen FLAG und HA analysiert. Der Input entspricht 2 % des für die Immunpräzipitation eingesetzten Lysates.
- (C) Die Phosphorylierung an Ser 227 hat keinen Einfluss auf die Fähigkeit von Fbw7, Dimere auszubilden. Das Experiment wurde durchgeführt wie in 9B, allerdings wurden die Zellen mit HA-Fbw7-Wildtyp und FLAG-Fbw7-Wildtyp bzw. -S227A transfiziert.

³ diese Abbildung wurde in ähnlicher Form veröffentlicht in Schüle, C., and Eilers, M., Popov, N. (2011). PI3K-dependent phosphorylation of Fbw7 modulates substrate degradation and activity. FEBS Lett 585, 2151-2157.

6.1.5 Die Phosphorylierung von Serin 227 ist notwendig für die biologische Aktivität von Fbw7

Es ist bekannt, dass Fbw7 eine Rolle bei der Regulation von Zellzyklusarrest und Apoptose spielt (Ishikawa et al., 2008; Nateri et al., 2004). Mit Hilfe der Fbw7-defizienten HCT116-Zellen sollte untersucht werden, ob die Phosphorylierung von Serin 227 diese Funktion von Fbw7 beeinflusst. Unter normalen Wachstumbedingungen (10 % FBS) waren kaum Unterschiede in der Zellzyklusverteilung zwischen den mit Leervektor, Fbw7-Wildtyp oder der Fbw7-S227A-Mutante rekonstituierten Zellen festzustellen (Abb. 10A, oben). Unter Serumentzug (0,05 % FBS) zeigten jedoch die mit Fbw7-Wildtyp transduzierten Zellen eine stärkere Induktion von Apoptose (Zellen mit einem subG1-DNA-Gehalt) als die Leervektor- oder S227A-exprimierenden Zellen (Abb. 10A, unten), übereinstimmend mit einer geringeren biologischen Aktivität der Fbw7-S227A-Mutante.

Um herauszufinden, wie der Phosphorylierungsstatus an S227 die Aktivität von Fbw7-Substraten beeinflusst, wurde mit Hilfe von qRT-PCR-Experimenten die mRNA-Expression von Myc-Zielgenen in Fbw7-defizienten und rekonstituierten HCT116-Zellen verglichen. Zunächst wurde sichergestellt, dass die Wildtyp- und S227A-*FBXW7* mRNAs in ungefähr gleichem Ausmaß exprimiert wurden. Somit liegt den niedrigeren Proteinmengen der S227-Mutante eine verringerte Proteinstabilität zugrunde (Abb. 10B). Bei den transkriptionellen Zielgenen von Myc konnte festgestellt werden, dass ein Teil von ihnen in gleicher Weise auf die Rekonstitution mit Fbw7-Wildtyp und -S227A reagierte, während andere eine schwächere Reaktion auf das mutierte Protein zeigten (Abb. 10C). Daraus kann geschlossen werden, dass verschiedene Zielgene von Myc unterschiedlich stark auf Änderungen der Myc-Proteinmenge reagieren und dass für manche Zielgene eine verstärkte Aktivität von Fbw7 notwendig ist, um der Regulation durch Myc entgegenzuwirken.

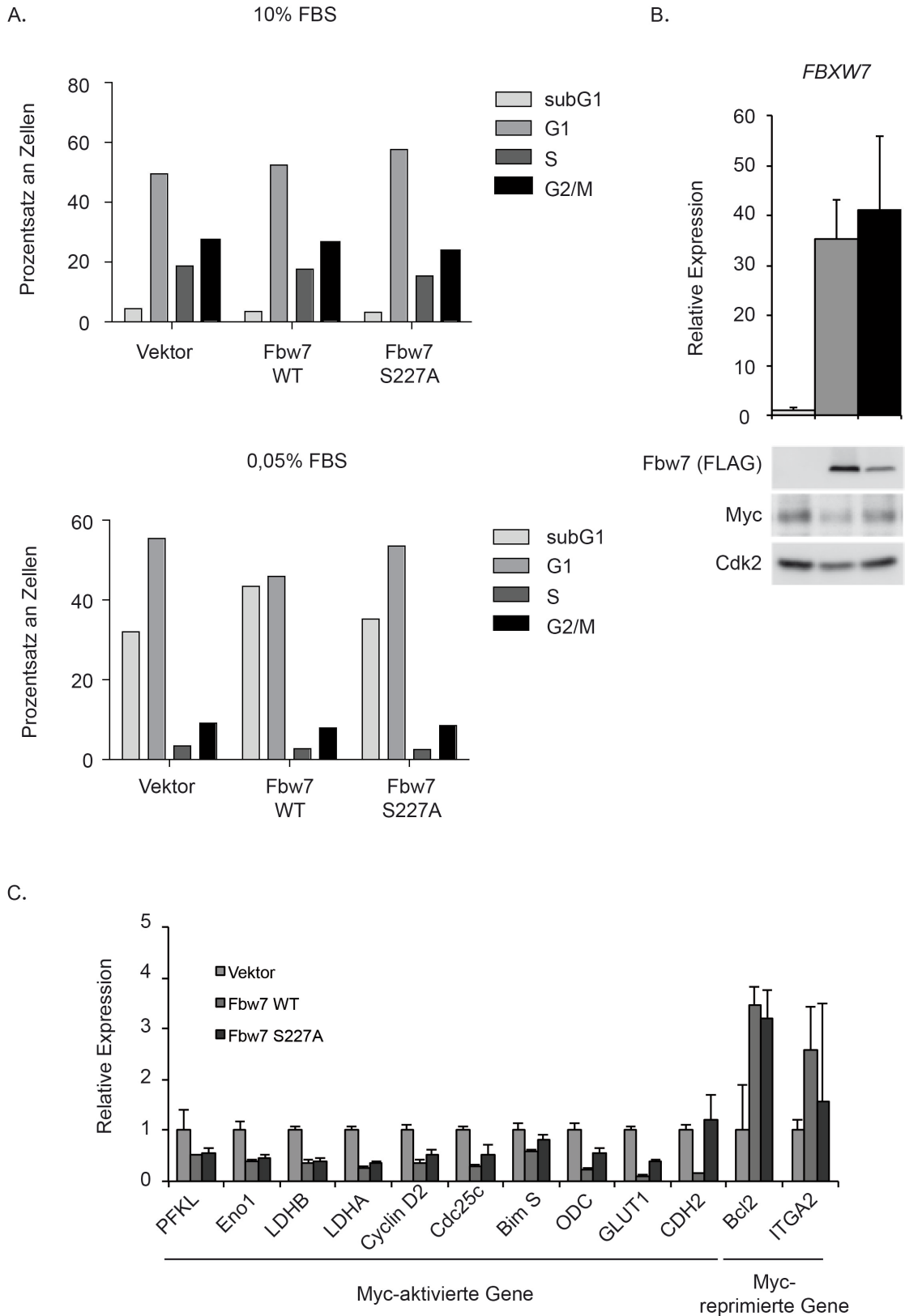


Abb. 10: Die Phosphorylierung von Ser 227 ist notwendig für biologische Funktionen von Fbw7⁴

- (A) Serumentzug löst in Fbw7-S227A-exprimierenden Zellen eine stärkere apoptotische Antwort aus. Fbw7-defiziente HCT116-Zellen wurden retroviral mit Leervektor, FLAG-Fbw7-WT oder -S227A infiziert. Nach der Selektion wurden die Zellen in Medium mit 10 % oder 0,05 % FBS kultiviert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen in Ethanol fixiert, mit Propidiumiodid gefärbt und mittels FACS-Analyse untersucht.
- (B) und (C) Eine Gruppe von Myc-Zielgenen zeigt eine abgeschwächte Reaktion auf die Fbw7-S227A-Mutante im Vergleich zu Fbw7-WT. Fbw7-defiziente HCT116-Zellen wurden infiziert wie in 10A. Gesamt-RNA wurde extrahiert und cDNA hergestellt. Die Expressionslevel von *FBXW7* und verschiedenen transkriptionellen Zielgenen von Myc wurden durch qRT-PCR bestimmt und als Mittelwerte +SD (n=3) dargestellt. Zusätzlich wurden die Proteinlevel von Fbw7 und Myc im Western Blot analysiert. Cdk2 diente als Ladekontrolle.

⁴ diese Abbildung wurde in ähnlicher Form veröffentlicht in Schülein, C., and Eilers, M., Popov, N. (2011). PI3K-dependent phosphorylation of Fbw7 modulates substrate degradation and activity. *FEBS Lett* 585, 2151-2157.

6.2 Die Validierung von Usp28 als therapeutisches Zielprotein in Myc-induzierten Tumoren

6.2.1 Etablierung eines konditionalen *Knockout*-Mausmodells für Usp28

Um das Potential von Usp28 als therapeutischen Angriffspunkt zu validieren, sollte ein konditionales *Knockout*-Mausmodell hergestellt werden. Ein konditionales Modell hat den Vorteil, dass der Zeitpunkt des *Knockouts* gewählt werden kann, ebenso wie die Gewebe, in denen das Zielgen abgeschaltet werden soll, sodass spezifische Untersuchungen auch in Fällen möglich sind, wo ein konstitutiver *Knockout* letal wäre.

Die Firma Taconic Artemis in Köln generierte in Kooperation mit unserer Arbeitsgruppe ein konditionales Usp28-*Knockout*-Mausmodell, das die Deletion der katalytischen Domäne (kodiert durch die Exons 4 und 5) von Usp28 ermöglicht. Hierfür wurde ein Zielvektor verwendet, in dem die Exons 4 und 5 des murinen *usp28*-Gens von LoxP-Sequenzen flankiert („gefloxt“; fl) sind, die das gezielte Entfernen dieser genomischen Region durch eine Cre-Rekombinase ermöglichen. Zusätzlich führt diese Deletion zu einer Leserasterverschiebung in allen folgenden Exons, was zum Kettenabbruch bei der Translation führt (Abb. 11A, B).

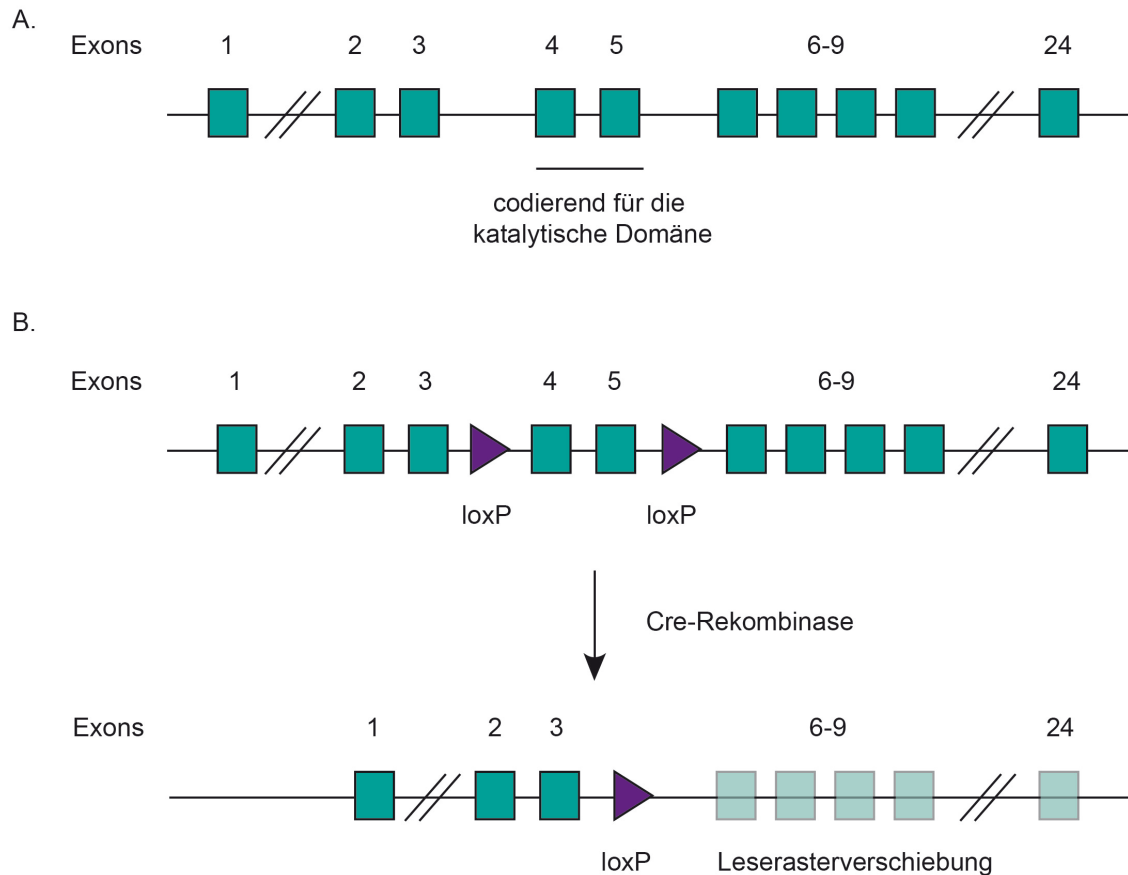
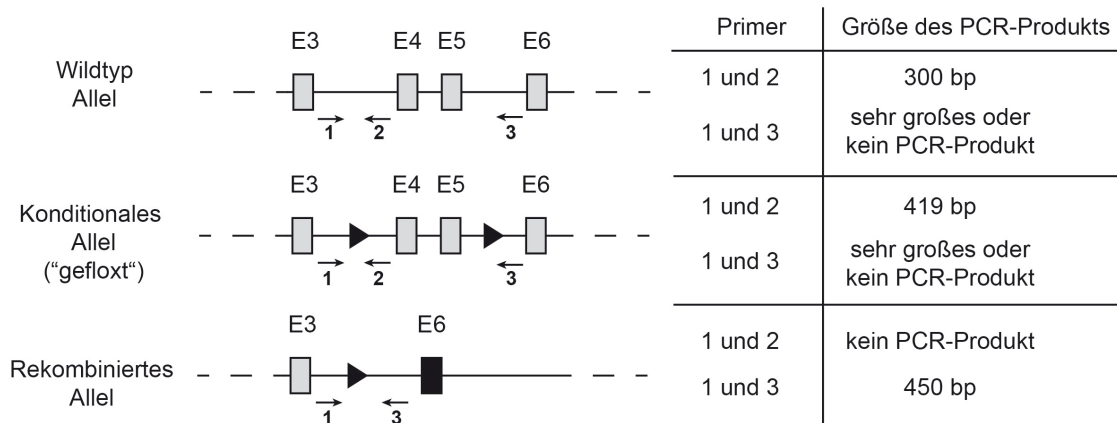


Abb. 11: Schematische Darstellung der Generierung des konditionalen *Knockout*-Mausmodells für *Usp28*

- (A) Der murine genomische *Usp28*-Locus. Exons sind als Boxen dargestellt. Exon 4 und 5 codieren für einen Teil der Peptidasedomäne von *Usp28* (das katalytische Cystein 171 ist in Exon 5 codiert).
- (B) Das transgene („gefloxte“) *Usp28*-Allel vor und nach der homologen Rekombination. Die Exons 4 und 5 sind von *LoxP*-Sequenzen flankiert. Durch die *Cre*-vermittelte Rekombination zwischen den beiden *LoxP*-Sequenzen kommt es zur Deletion der flankierten Region. Übrig bleibt nur eine *LoxP*-Sequenz. Es kommt zu einer Leserasterverschiebung in allen folgenden Exons.

Die zwei von Taconic Artemis zur Verfügung gestellten Zuchtpaare, die heterozygot für das geflochte *Usp28*-Allel waren, wurden verpaart, um homozygote Tiere zu erhalten. Durch spezifische PCR-Primer konnte in der PCR mit genomischer DNA aus Schwanzbiopsien der Jungtiere zwischen dem Wildtyp- und dem geflochten Allel unterschieden werden, da die *LoxP*-Sequenzen das PCR-Produkt um 119 Basenpaare vergrößern (Abb. 12A). Ein homozygotes Wildtyp-Tier besitzt also nur das kleinere Wildtyp-Allel, ein homozygot gefloxtes Tier nur das größere, konditionale Allel und ein heterozygot Tier beide Allele (Abb. 12B).

A.



B.

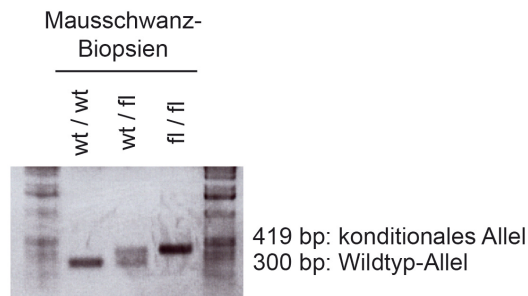


Abb. 12: Durch Genotypisierungs-PCRs können die verschiedenen Genotypen verifiziert werden.

- (A) Die Tabelle rechts zeigt die Größen der PCR-Produkte, die bei einer PCR der unterschiedlichen Allele (links dargestellt) mit den verschiedenen Primerkombinationen entstehen.
- (B) Gezeigt ist das Ergebnis einer Genotypisierungs-PCR von genomischer DNA, die aus Mausschwanz-Biopsiematerial isoliert wurde. Durch den Einsatz der Primer 1 und 2 konnte das Wildtyp- und das konditionale Allel unterschieden werden.

Zuerst sollten murine embryonale Fibroblasten (MEFs) charakterisiert werden, die am Tag 13,5 der Embryonalentwicklung aus Usp28 fl/fl Embryonen isoliert wurden. Der Kopf der Embryonen wurde zur Isolation genomischer DNA verwendet und mittels Genotypisierungs-PCR der korrekte Genotyp jedes einzelnen Embryos bestätigt. Primäre Säugerzellen, die in Kultur genommen werden, besitzen nur ein begrenztes Replikationspotential und werden nach einigen Passagen seneszent (Hayflick and Moorhead, 1961; Todaro and Green, 1963). Im Gegensatz zu humanen Zellen, in denen die zunehmende Verkürzung der Telomere zum replikativen Arrest führt, stellt in Nagerzellen die Aktivierung von Zellzyklusinhibitoren (z. B. p19^{ARF} und p16^{Ink4a}) den limitierenden Faktor für die Immortalisierung dar (zusammengefasst in (Sherr and DePinho, 2000)). Das

Ausschalten des p19^{ARF}-Mdm2-p53-Signalweges reicht aus, um murine embryonale Fibroblasten zu immortalisieren (Zindy et al., 1997). Daher wurden die primären Usp28 fl/fl-MEFs mit einer shRNA gegen p19^{ARF} infiziert und somit kontinuierlich proliferierende Zelllinien geschaffen, die langfristig in Kultur gehalten werden konnten.

6.2.2 Die retrovirale Infektion von MEFs mit einer Cre-Rekombinase führt zur Deletion von Usp28, reduziert aber weder Myc-Proteinlevel noch Proliferation

Um nun in diesen immortalen, homozygot geflochten MEFs Usp28 auszuschalten, wurden sie mit einem Vektor infiziert, der für eine Cre-Rekombinase kodiert. Nach erfolgreicher Selektion wurde aus den Zellen genomische DNA isoliert, um in der Genotypisierungs-PCR die Rekombination nachzuweisen. Dafür wurden Primer verwendet, die die Exons 4 und 5 umspannen und nur nach erfolgter Deletion dieser Region ein Produkt von 450 Basenpaaren bilden können. Sind die Exons 4 und 5 nicht deletiert, ist das PCR-Produkt sehr groß und wird nicht immer hergestellt. Die PCR für das geflochte Allel kann hingegen nach einer vollständigen Rekombination nicht mehr funktionieren, da die Bindestelle für den reversen Primer in der deletierten Region liegt (Abb. 12A und 13A). Als ein weiterer Nachweis der erfolgreichen Deletion wurde RNA isoliert und durch qRT-PCR analysiert. Mit einem Primerpaar, das Exon 4 und 5 von Usp28 umspannt, konnte eine starke Reduktion der *Usp28* mRNA nachgewiesen werden (Abb. 13B). Außerdem wurden Proteinextrakte der Zellen hergestellt und im Western Blot analysiert. Während die Usp28-Deletion auch auf Proteinebene nachweisbar war, konnte das murine Myc-Protein nur schwer detektiert werden und zeigte keine starke Veränderung zwischen Leervektor- und Cre-infizierten Zellen (Abb. 13C). Um den Einfluss der Usp28-Deletion auf das Wachstum der MEFs zu untersuchen, wurde eine Kristallviolett-färbung durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Usp28-Deletion das Wachstum der Zellen nicht verringert hat, vielmehr wuchsen die Cre-infizierten Zellen sogar etwas besser als die Kontrolle (Abb. 13D).

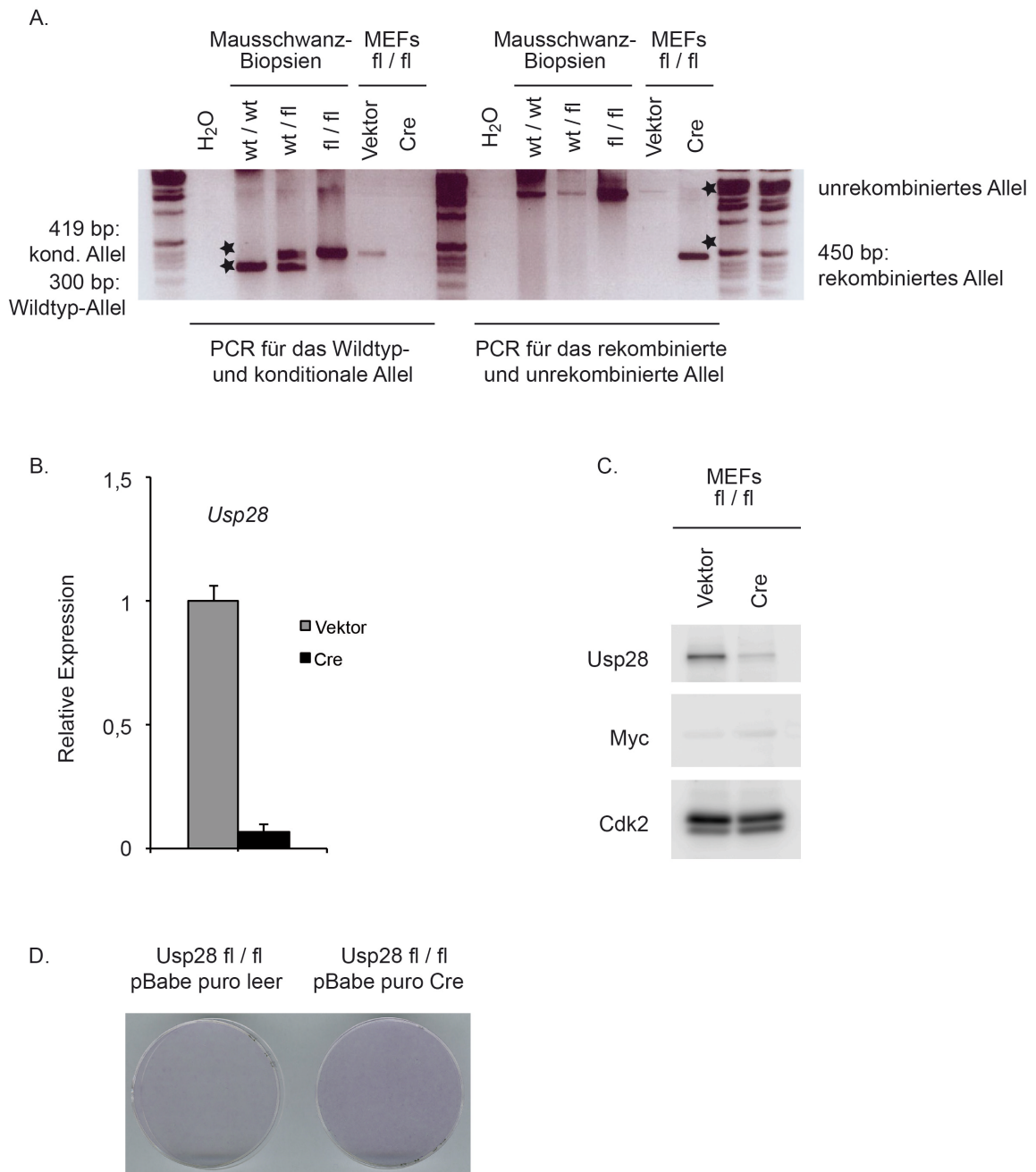


Abb. 13: Die retrovirale Infektion der MEFs mit Cre-Rekombinase führt zur Deletion von Usp28, reduziert aber weder Myc-Proteinlevel noch Proliferation

- (A) Die retrovirale Infektion der geflochtenen MEFs mit Cre-Rekombinase führt zu einer effizienten Deletion von Usp28. Die MEFs wurden infiziert, nach der Selektion geerntet und genomische DNA isoliert. In der Genotypisierungs-PCR konnte das rekombinierte Allel in den Cre-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden, während das geflochte Allel in diesen Zellen nicht mehr nachweisbar ist. Das spricht für eine hohe Rekombinationseffizienz. Zum Vergleich wurde die PCR auch mit DNA aus Mausschwanz-Biopsien verschiedener Genotypen durchgeführt.
- (B) Auch auf RNA-Ebene ist die Deletion von Usp28 nachweisbar. Aus den mit Leervektor bzw. Cre infizierten, geflochtenen MEFs wurde Gesamt-RNA extrahiert und daraus cDNA hergestellt. Die Expressionslevel von Usp28 wurden durch qRT-PCR bestimmt und als Mittelwerte +SD (n=3) dargestellt. Dafür wurden Primer verwendet, die in der rekombinierten Region binden.

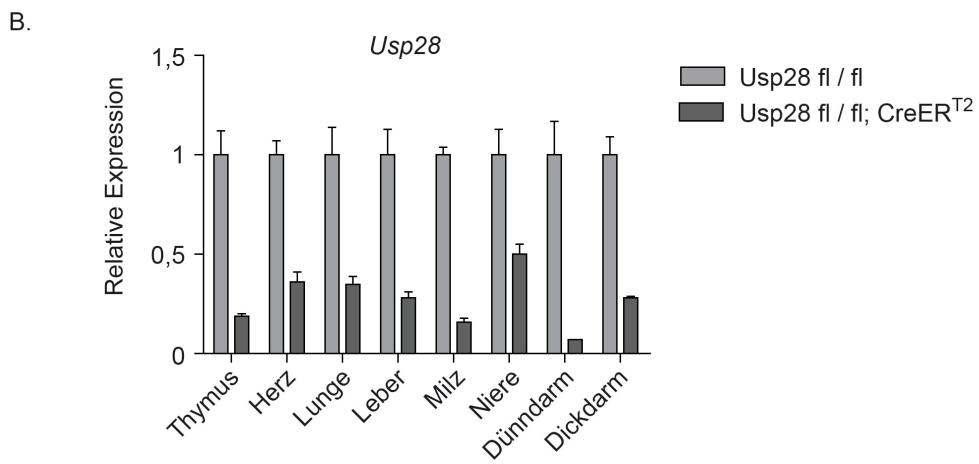
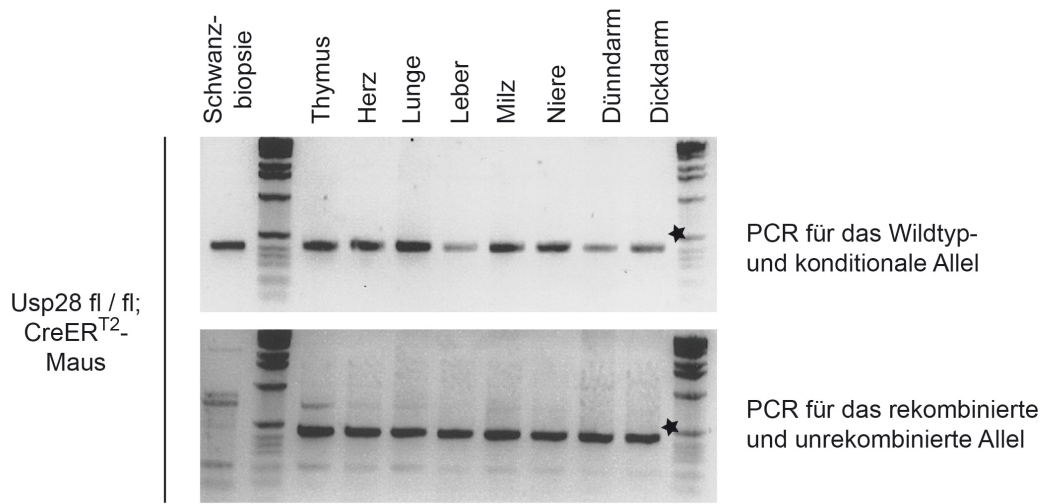
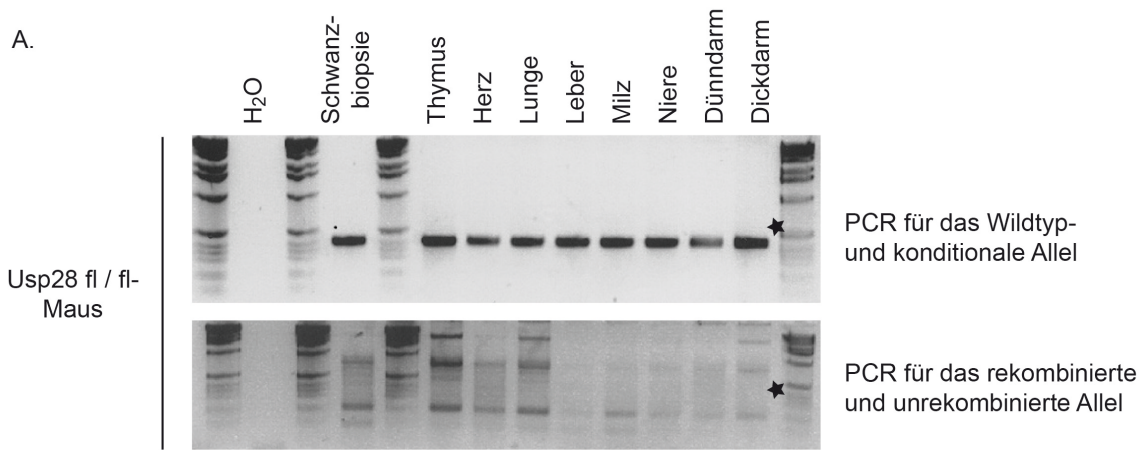
- (C) Auf Proteinebene ist die Reduktion von Usp28 erkennbar, es ist jedoch kein Einfluss auf die Menge an Myc-Protein nachweisbar. MEFs wurden infiziert wie in 13A und B und Proteinextrakte hergestellt. Mit Antikörpern gegen Usp28 und Myc wurden die Proteinmengen untersucht. Cdk2 diente als Ladekontrolle.
- (D) Die retrovirale Infektion der geflochten MEFs mit Cre-Rekombinase hat keinen negativen Effekt auf die Proliferation der Zellen. MEFs wurden infiziert wie oben beschrieben und jeweils 10.000 Zellen auf eine 6 cm-Schale ausplattiert. Nach 10 Tagen wurden die Zellen durch Kristallviolett-Färbung visualisiert.

6.2.3 Die Aktivierung der Rosa26-CreER^{T2} in Usp28 fl/fl-Mäusen führt zu einer partiellen Deletion von Usp28 in verschiedenen Organen

Um eine Usp28-Deletion in der Maus zu erreichen, müssen die Usp28 fl/fl-Tiere mit einem Mausstamm gekreuzt werden, der eine Cre-Rekombinase exprimiert. Eine Möglichkeit, eine induzierbare, akute Deletion zu erzielen, stellt die Kreuzung mit Rosa26-CreER^{T2}-Mäusen dar. Dieser Mausstamm trägt eine konditionale Cre-Rekombinase im Rosa26-Locus, der eine ubiquitäre und konstitutive Expression des Cre-Transgens erlaubt. Die Regulation der Cre-Rekombination erfolgt auf Proteinebene: die Cre-Rekombinase ist mit der Hormonbindedomäne des Östrogenrezeptors (ER) fusioniert, welche die Cre-Rekombinase inaktiv im Zytoplasma hält. Durch Tamoxifen-Administration wird diese Inhibierung aufgehoben, die Cre-Rekombinase kann in den Zellkern translozieren und dort die Rekombination von LoxP-Sequenzen katalysieren. Die Hormonbindedomäne ist dabei so mutiert, dass sie nicht auf natürlich vorkommendes Östrogen reagiert, sondern nur auf den synthetischen Östrogen-Antagonisten Tamoxifen (Vooijs et al., 2001). Dieses System erlaubt eine akute Deletion des geflochten Gens, mit der Möglichkeit, den Zeitpunkt und die Art der Tamoxifen-Administration zu wählen. Bei Genen, deren Verlust embryonal letal ist, kann der Zeitpunkt so gewählt werden, dass die Entwicklung abgeschlossen ist. In einem Tumormodell kann der Effekt der Deletion auf etablierte Tumore getestet werden.

Um die Rekombinationseffizienz mit diesem System zu testen, wurde einer 8 Wochen alten Usp28 fl/fl; Rosa26-CreER^{T2}-Maus, sowie einer Kontrollmaus ohne CreER^{T2} an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 1 mg Tamoxifen (gelöst in Erdnussöl) intraperitoneal injiziert. Am vierten Tag wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und Proben von verschiedenen Organen für weitere Analysen entnommen. Die aus den Proben gewonnene genomische DNA zeigte das PCR-Signal für das rekombinierte Allel in allen untersuchten Organen der Usp28 fl/fl; Rosa26-CreER^{T2}-Maus, jedoch nicht in der Kontrollmaus ohne Cre. Zum Vergleich wurde die PCR jeweils auch mit der DNA aus der

Schwanzbiopsie der entsprechenden Maus durchgeführt, um den Zustand vor der Behandlung darzustellen. Die PCR für das gefloخته (nicht-rekombinierte) Allel gab jedoch ebenfalls in allen untersuchten Organen der *Usp28 fl/fl; Rosa26-CreER^{T2}*-Maus ein Signal, was darauf hindeutet, dass zwar Rekombination stattfindet, diese jedoch nicht vollständig ist (Abb. 14A). Es ist allerdings davon auszugehen, dass die Cre-Rekombinase in einer Zelle in jedem Fall vollständig wirkt, d. h. dass Zellen mit kompletter Deletion und Zellen ohne Deletion vorliegen, jedoch kein heterozygoter Genotyp (Daniel J. Murphy, persönliche Mitteilung). Auch die qRT-PCR-Analyse der RNA aus den Organproben zeigt, dass im Vergleich zum Kontrolltier nur eine partielle Reduktion der *Usp28*-RNA von 50 bis 90 %, je nach Organ, vorliegt (Abb. 14B). Die Analyse von Proteinextrakten aus den Organproben gestaltete sich schwierig, da die verwendeten Antikörper nicht in jeder Probe ein spezifisches Signal gaben. Es konnte jedoch die Reduktion der *Usp28*-Proteinmenge im *Usp28 fl/fl; Rosa26-CreER^{T2}*-Tier zumindest in einigen Organen bestätigt werden (Abb. 14C, Thymus, Leber, Dünndarm). Mit dem Myc-Antikörper wurden mehrere Banden detektiert, was die Identifizierung der korrekten Bande schwierig machte; nach der Größe ist jedoch davon auszugehen, dass die mittlere Bande (zwischen 55 und 72 kDa) dem Myc-Protein zugeordnet werden kann. Diese zeigte jedoch keine durchgängige Reduktion der Myc-Proteinmenge nach *Usp28*-Deletion; allenfalls in der Herzprobe, wo jedoch eine Aussage schwierig ist, da hier keine Ladekontrolle sichtbar ist. Im Thymus ist eine Zunahme der Myc-Proteinmenge nach *Usp28*-Deletion zu sehen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die induzierbare *Rosa26-CreER^{T2}*-Rekombinase nach Tamoxifeninjektion in allen untersuchten Organen zur Rekombination der gefloختen *Usp28*-Allele geführt hat, die Rekombinationseffizienz jedoch nicht mehr als 50 % beträgt und keine deutlichen Effekte auf die Menge an Myc-Protein festgestellt werden konnten.



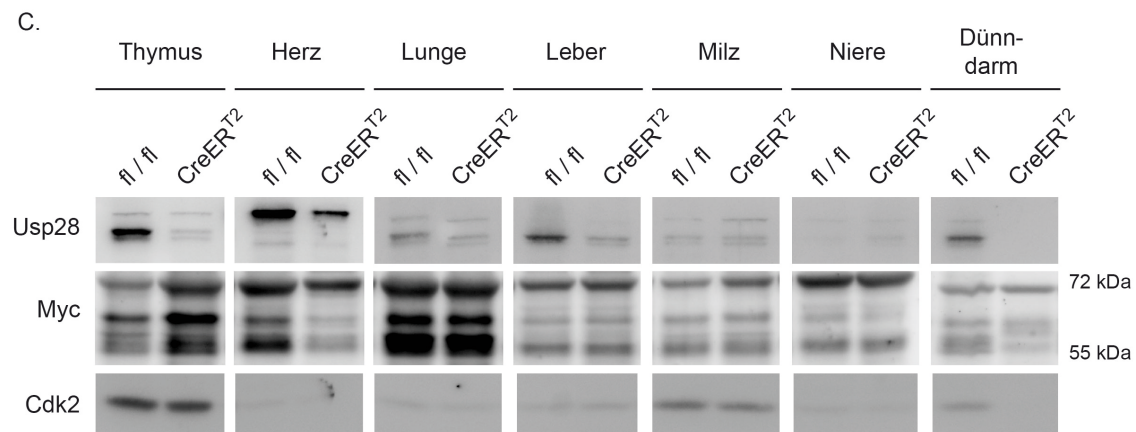


Abb. 14: Die Aktivierung der Rosa26-CreER^{T2} in Usp28 fl/fl-Mäusen führt zu einer partiellen Deletion von Usp28 in verschiedenen Organen, hat jedoch keinen messbaren Einfluss auf die Myc-Proteinmengen

- (A) Die Aktivierung der konditionalen Cre-Rekombinase führt zur partiellen Rekombination von Usp28 in verschiedenen Organen. Je einer Kontrollmaus (Usp28 fl/fl) und einer Usp28 fl/fl; Rosa26-CreER^{T2}-Maus wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen 1 mg Tamoxifen in Erdnussöl intraperitoneal injiziert. Am vierten Tag wurden die Mäuse getötet, Organproben entnommen, genomische DNA isoliert und Genotypisierungs-PCRs durchgeführt.
- (B) Auch auf RNA-Ebene ist die partielle Deletion von Usp28 nachweisbar. Aus den Organproben wurde Gesamt-RNA extrahiert und daraus cDNA hergestellt. Die Expressionslevel von *Usp28* wurden durch qRT-PCR bestimmt und als Mittelwerte +SD (n=3) dargestellt. Dafür wurden Primer verwendet, die innerhalb der rekombinierten Region binden.
- (C) Auf Proteinebene ist die Reduktion an Usp28 zu erkennen, es ist jedoch kein deutlicher Einfluss auf die Myc-Proteinmengen nachweisbar. Aus den Organproben wurden Proteinextrakte hergestellt und im Western Blot mit Antikörpern gegen Usp28 und Myc untersucht. Cdk2 diente als Ladekontrolle.

6.2.4 Die Aktivierung der Rosa26-CreER^{T2} führt zu einer effizienten Deletion von Usp28 in murinen embryonalen Fibroblasten, beeinflusst allerdings weder Myc-Proteinlevel noch Proliferation

Um auch in der Zellkultur ein einfaches System für die induzierbare Usp28-Deletion zu haben, wurden murine embryonale Fibroblasten aus Usp28 fl/fl; Rosa26-CreER^{T2}-Embryonen isoliert und durch eine shRNA gegen p19^{ARF} immortalisiert. Durch Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) zum Medium konnte die Cre-vermittelte Rekombination von Usp28 induziert werden. Bei 4-OHT handelt es sich um ein aktives Metabolit von Tamoxifen. In Organismen wird Tamoxifen durch Cytochrome der Leber in Metabolite wie 4-OHT umgewandelt, die eine sehr viel höhere Affinität zum Östrogenrezeptor zeigen als Tamoxifen selbst. Die Genotypisierungs-PCR und die qRT-PCR-Analyse zeigen, dass eine Behandlung mit 200 nM 4-OHT für 45 Stunden zu einem vollständigen Usp28-Verlust führt (Abb. 15A und B). Das zeigt auch, dass die Rosa26-CreER^{T2} sehr effizient ist und dass folglich der Grund für die nur partielle Reduktion von

Usp28 in der injizierten Maus bei der Verteilung des Tamoxifens zu suchen ist, dass also nicht alle Zellen innerhalb eines Organes vom Tamoxifen erreicht werden. Die Western Blot-Analyse von Proteinlysaten dieser MEFs zeigt ebenso die 4-OHT-induzierte Usp28-Deletion, bei den Myc-Proteinmengen ist wieder keine Veränderung zwischen der Ethanolkontrolle und den 4-OHT-behandelten Zellen festzustellen (Abb. 15C). Die Kristallviolett-färbung zur Analyse der Proliferation zeigt keine Wachstumsunterschiede zwischen 4-OHT-behandelten und unbehandelten Usp28 fl/fl; Rosa26-CreER^{T2}-Zellen. Um auszuschließen, dass 4-OHT selbst einen Effekt auf die Proliferation hat, wurden parallel auch Usp28 fl/fl-Zellen ohne CreER^{T2} mit Ethanol bzw. 4-OHT behandelt (Abb. 15D).

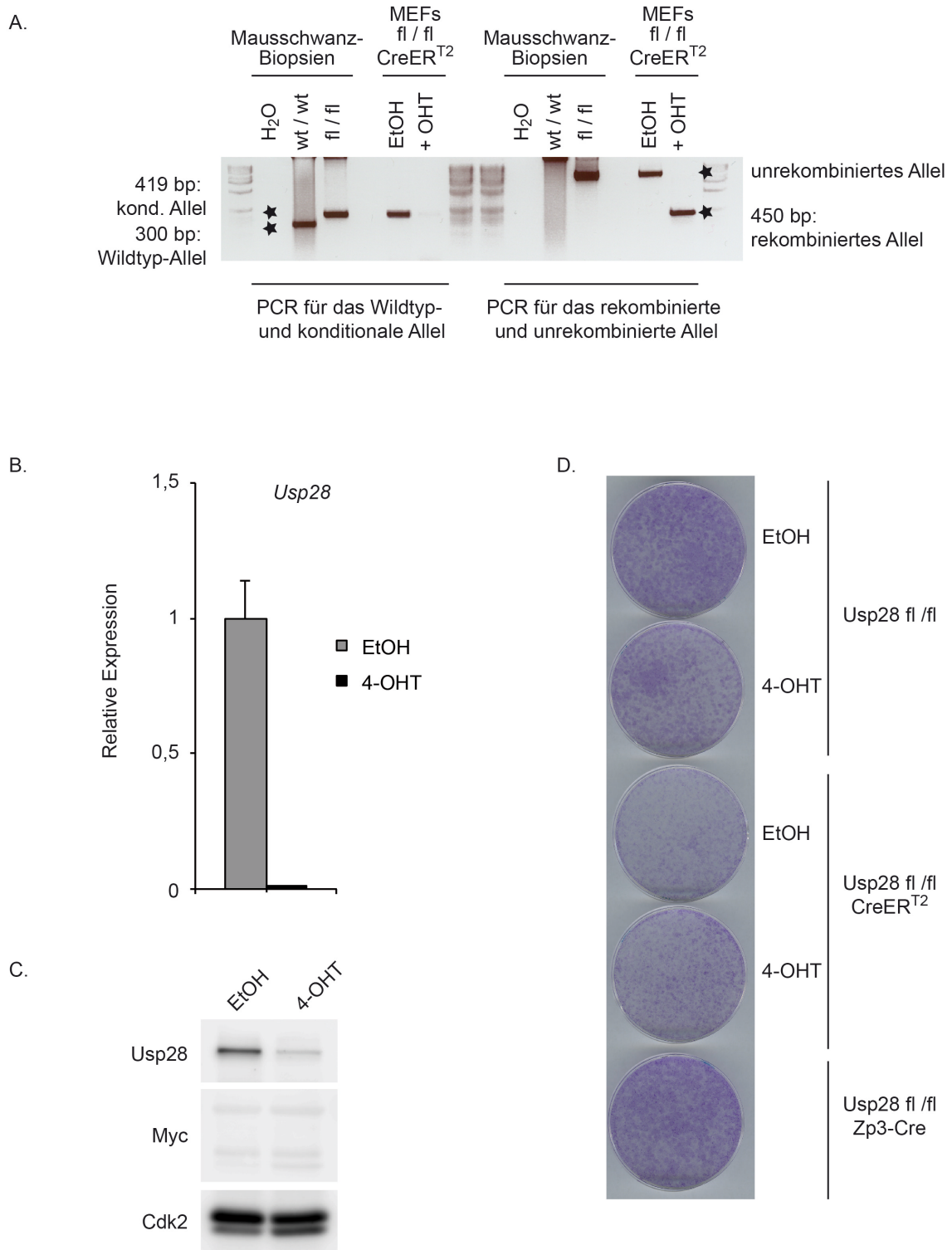


Abb. 15: Die Aktivierung der Rosa26-CreER^{T2} führt zu einer effizienten Deletion von Usp28 in murinen embryonalen Fibroblasten, beeinflusst allerdings weder Myc-Proteinlevel noch Proliferation

(A) Die Aktivierung der konditionalen Cre-Rekombinase führt zu einer effizienten Rekombination von Usp28 in embryonalen Fibroblasten. Usp28 fl/fl;CreER^{T2}-MEFs wurden für 45 Stunden mit 200 nM 4-OHT oder nur mit dem Lösungsmittel Ethanol behandelt. Nach der Ernte wurde genomische DNA isoliert und Genotypisierungs-PCRs durchgeführt. Zum Vergleich wurden die PCRs auch mit Material aus Schwanzbiopsien verschiedener Genotypen durchgeführt.

- (B) Auch auf RNA-Ebene ist die effiziente Deletion von Usp28 nachweisbar. Die MEFs wurden behandelt wie in 15A, Gesamt-RNA wurde extrahiert und daraus cDNA hergestellt. Die Expressionslevel von *Usp28* wurden durch qRT-PCR bestimmt und als Mittelwerte \pm SD (n=3) dargestellt. Dafür wurden Primer verwendet, die in der rekombinierten Region binden.
- (C) Auf Proteinebene ist die Reduktion an Usp28 zu erkennen, jedoch kein deutlicher Einfluss auf die Myc-Proteinmengen nachweisbar. Aus den MEFs wurden Proteinextrakte hergestellt und im Western Blot mit Antikörpern gegen Usp28 und Myc untersucht. Cdk2 diente als Ladekontrolle.
- (D) Die Behandlung der MEFs mit 4-OHT hat keinen Effekt auf die Proliferation der Zellen. MEFs wurden behandelt wie oben beschrieben und jeweils 10.000 Zellen auf eine 6 cm-Schale ausplattiert. Nach 10 Tagen wurden die Zellen durch Kristallviolett färbung visualisiert.

6.2.5 Der akute Verlust von Usp28 in murinen embryonalen Fibroblasten hat keinen Einfluss auf die Proteinstabilität von Myc oder die DNA-Schadensantwort

Um zu testen, ob ein akuter Usp28-Verlust durch 4-OHT-Gabe in Usp28 fl/fl; Rosa26-CreER^{T2}-MEFs die Myc-Proteinstabilität beeinflusst, wurden mit Ethanol- bzw. 4-OHT-behandelte Zellen mit Cycloheximid (CHX) inkubiert. Dieser Translationsinhibitor blockiert die Proteinneusynthese und ermöglicht so, die Abbaugeschwindigkeit von Proteinen zu bestimmen. Es konnte jedoch weder für das Myc-Gesamtprotein, noch für die T58-phosphorylierte Fraktion von Myc (die spezifisch mit Fbw7 interagiert und somit der Stabilisation durch Usp28 zugänglich ist) ein Abbau nach 100 Minuten festgestellt werden. Zur Kontrolle wurde die Membran auch mit einem Antikörper gegen Zyklin D1 inkubiert, das einen zeitabhängigen Abbau in diesem Experiment zeigt. Somit ist sichergestellt, dass die Cycloheximid-Gabe generell funktioniert hat, dass jedoch in diesem Versuchsaufbau kein Abbau von murinem Myc nachweisbar ist (Abb. 16A).

Da Usp28 eine Rolle in der DNA-Schadensantwort spielt, indem es zum Beispiel 53BP1 nach DNA-Schaden stabilisiert (Popov et al., 2007a; Zhang et al., 2006), sollte untersucht werden, ob die akute Usp28-Deletion in MEFs die Reaktion auf UV-induzierten DNA-Schaden beeinflusst. Dafür wurden mit Ethanol bzw. 4-OHT behandelte Zellen für eine Minute mit UVB-Strahlung behandelt und nach 2 und 4 Stunden im Western Blot analysiert. Es konnte keine Stabilisierung von 53BP1 nach der Bestrahlung nachgewiesen werden und in den Usp28-deletierten Zellen lagen leicht erhöhte Mengen an 53BP1 vor. Die Bestrahlung an sich hat funktioniert, da bekannte DNA-Schadensantwort-Proteine wie p53 (Gesamtprotein und die aktive, an S15 phosphorylierte Form), und aktives, S345-phosphoryliertes Chk1 nach der Bestrahlung akkumulierten (Shieh et al., 1997; Walworth and Bernards, 1996) (Abb. 16B).

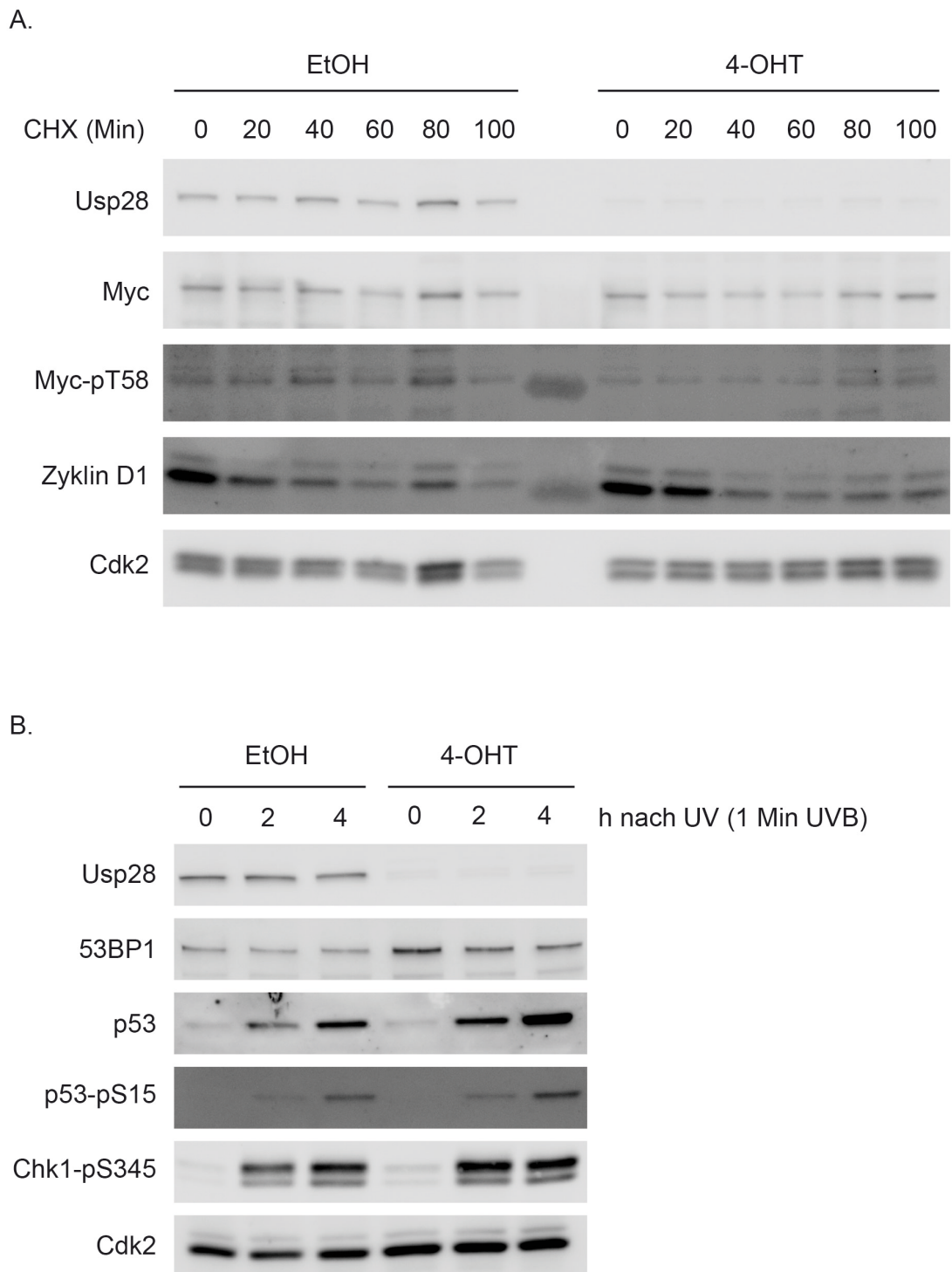


Abb. 16: Der akute Verlust von Usp28 in murinen embryonalen Fibroblasten hat keinen Einfluss auf die Proteinstabilität von Myc oder die DNA-Schadensantwort

- (A) In den Usp28 fl/fl; CreER^{T2}-MEFs kann im Cycloheximid Assay kein Abbau von Myc nachgewiesen werden. Die mit 4-OHT oder Ethanol behandelten MEFs wurden mit Cycloheximid (100 µg/ml) inkubiert, um die Proteinneusynthese zu inhibieren. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert.
- (B) In den Usp28 fl/fl; CreER^{T2}-MEFs hat die akute Usp28-Deletion keinen Einfluss auf die DNA-Schadensantwort. Die mit 4-OHT oder Ethanol behandelten MEFs wurden für eine Minute mit UVB-

Strahlung behandelt. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert.

6.2.6 Keimbahndeletion von Usp28 durch eine Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Zp3-Promotors

Die transgene Mauslinie Zp3-Cre exprimiert eine Cre-Rekombinase unter der Kontrolle der regulatorischen Sequenzen des Zona pellucida 3 (Zp3)-Gens, welches nur in der wachsenden Oozyte vor Beendigung der ersten meiotischen Teilung exprimiert wird (Lewandoski et al., 1997). Die Kreuzung dieser Mäuse mit den Usp28 fl/fl-Mäusen erlaubt eine Keimbahndeletion, d. h. einen konstitutiven und vollständigen Funktionsverlust von Usp28 bereits vor der Befruchtung. In somatischen Geweben ist meist keine Aktivität der Cre-Rekombinase mehr nachzuweisen. Mithilfe dieses Systems lässt sich untersuchen, ob ein bestimmtes Gen eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung hat, ein Verlust desselben also embryonal letal ist. In einem Tumormodell können die Auswirkungen eines Funktionsverlustes des geflochten Gens auf die Tumorentstehung untersucht werden. Um eine Keimbahndeletion von Usp28 zu erreichen, wurden zunächst Usp28 fl/fl-Tiere mit Zp3-Cre-Tieren verpaart, um weibliche Tiere zu erhalten, die sowohl das Cre-Transgen, als auch ein gefloxtes Usp28-Allel tragen. In den Oozyten eines solchen Weibchens kann dann die Rekombination des geflochten Usp28-Allels stattfinden und somit weibliche Nachkommen mit heterozygoter Keimbahndeletion von Usp28 und Zp3-Cre-Transgen erzeugt werden. Durch weiteres Verpaaren dieser Weibchen mit männlichen Tieren mit dieser heterozygoten Keimbahndeletion bekommt man Nachkommen mit hetero- oder homozygotem Usp28-Verlust (Abb. 17A), was durch Genotypisierungs-PCRs mit DNA aus Schwanzbiopsiematerial nachgewiesen wurde (Abb. 17B).

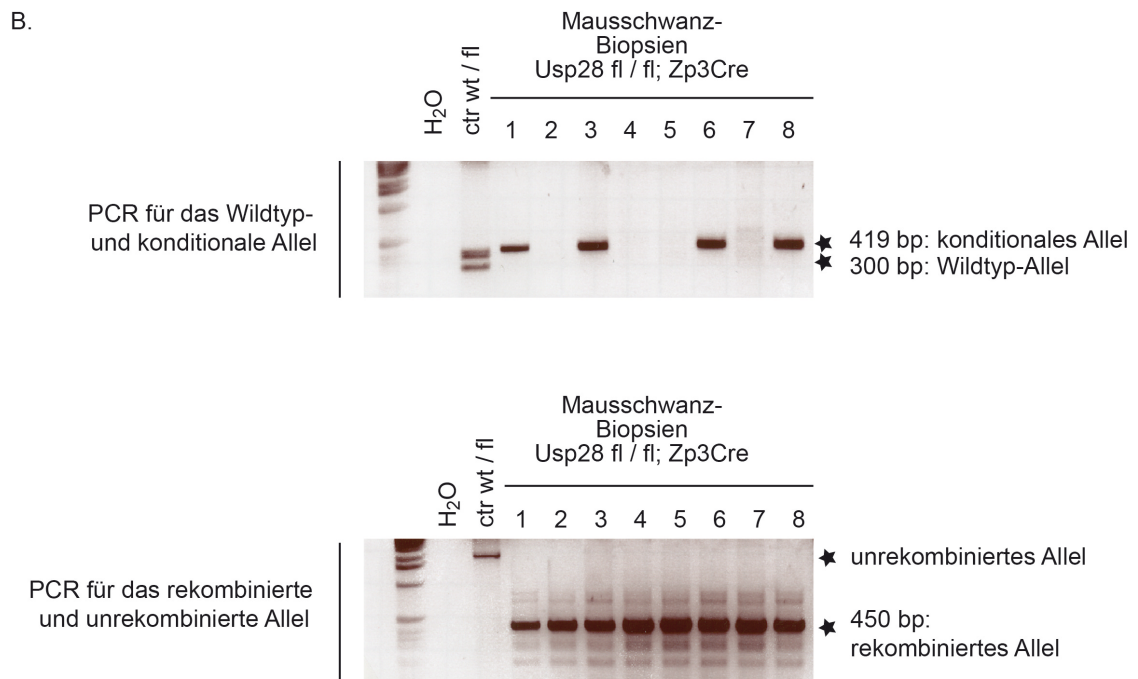
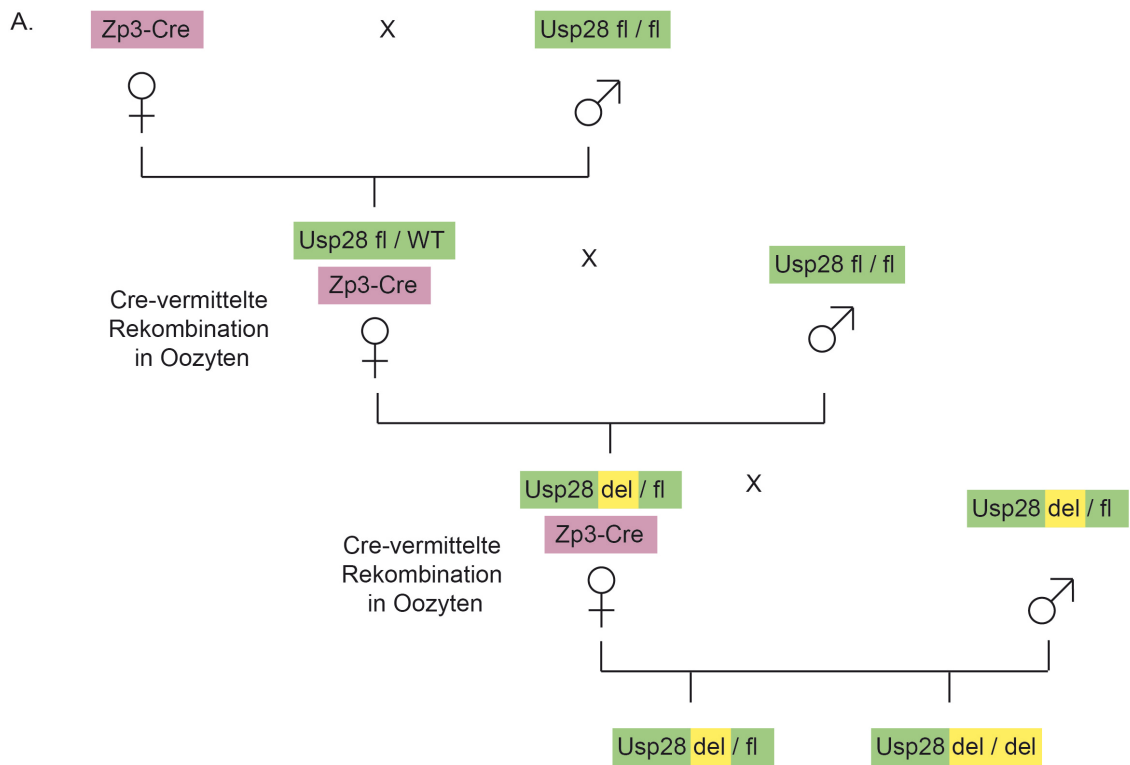


Abb. 17: Keimbahndeletion von Usp28 durch eine Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Zp3-Promotors

(A) Kreuzungsschema zur Erlangung einer Keimbahndeletion von Usp28 mit Hilfe von Zp3-Cre-Tieren. Zp3-Cre-Tiere werden mit Usp28 fl/fl-Tieren verpaart, um weibliche Nachkommen zu erhalten, die sowohl das Zp3-Cre-Transgen, als auch ein gefloxtes Usp28-Allel enthalten. In den Oozyten solcher Weibchen kommt es zur Deletion des gefloxtes Allels. Werden diese Tiere mit Usp28 fl/fl-Tieren

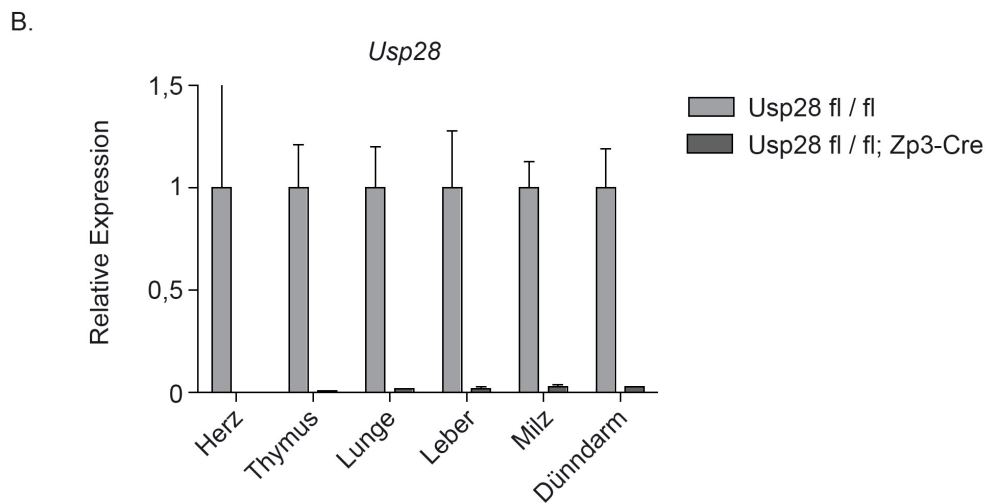
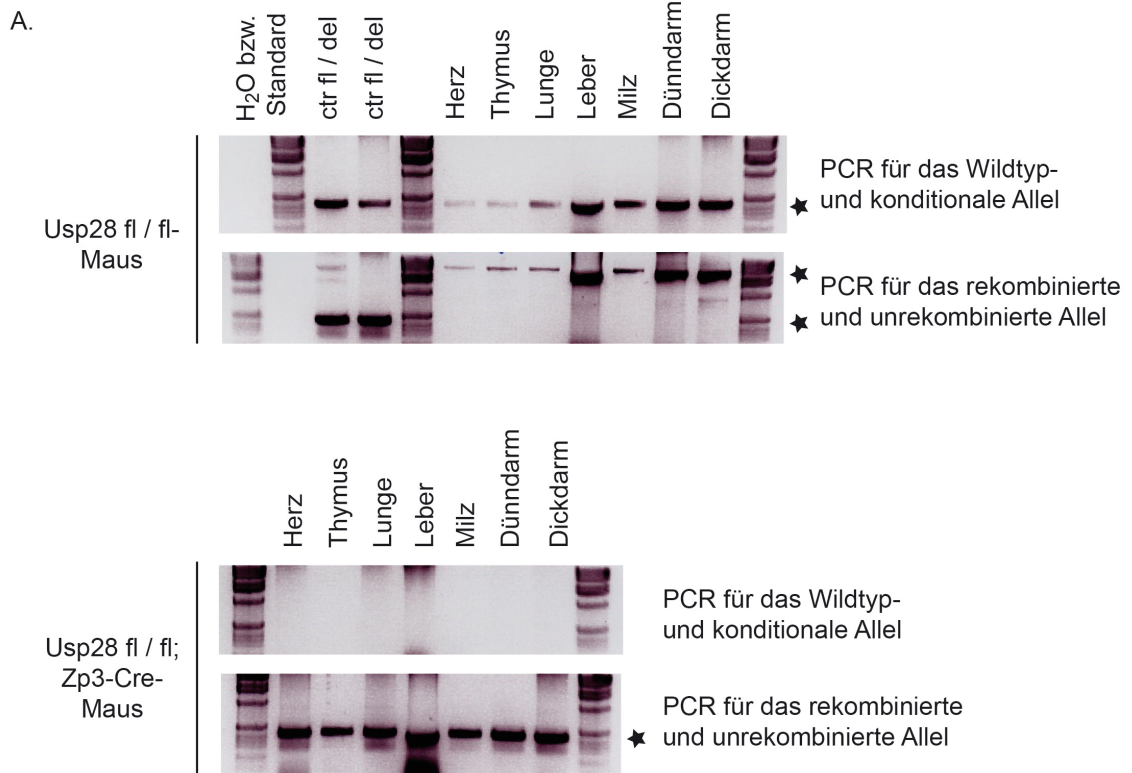
verpaart, erhält man Nachkommen mit heterozygoter Usp28-Deletion. Durch weitere Verpaarungen dieser Tiere untereinander bekommt man auch Nachkommen mit homozygoter Usp28-Deletion (angelehnt an (Lewandoski et al., 1997)).

- (B) Genotypisierungs-PCRs zum Nachweis der Keimbahndeletion von Usp28. Von einem Wurf von acht Tieren wurden Schwanzbiopsien entnommen, genomische DNA isoliert und Genotypisierungs-PCRs durchgeführt. Die PCR für das rekombinierte Allel (unten) zeigt, dass alle acht Tiere das rekombinierte Allel besitzen. Die PCR für das gefloxe Allel (oben) zeigt, dass die Tiere 1, 3, 6 und 8 auch noch das gefloxe Allel besitzen, also heterozygot deletiert sind, während die Tiere 2, 4, 5 und 7 eine komplette Deletion aufweisen.

6.2.7 Die Keimbahndeletion von Usp28 durch Zp3-Cre ist in allen untersuchten Organen sehr effizient; die Mäuse sind lebensfähig, fertil und phänotypisch unauffällig

Sowohl die Nachkommen mit heterozygoter, als auch mit homozygoter Usp28-Deletion waren lebensfähig, phänotypisch unauffällig und fertil. Somit kann festgestellt werden, dass ein Verlust von Usp28 in der Keimbahn nicht embryonal letal ist und keine offensichtlichen phänotypischen Auswirkungen hat.

Um zu überprüfen, ob die Zp3-Cre tatsächlich im kompletten Körper der Maus zu einer Usp28-Deletion geführt hat, wurde ein Usp28 del/del; Zp3-Cre-Tier und ein Usp28 fl/fl-Tier getötet und Proben von verschiedenen Organen entnommen, um DNA, RNA und Protein zu isolieren. Die Genotypisierungs-PCR bestätigte das ausschließliche Vorhandensein des geflochten Allels im Falle des Usp28 fl/fl-Tieres, sowie das ausschließliche Vorhandensein des rekombinierten Allels im Falle des Usp28 del/del; Zp3-Cre-Tieres in allen untersuchten Organen (Abb. 18A). Die qRT-PCR-Analyse der RNA-Proben dieser Organe zeigte, dass die *Usp28*-RNA im Usp28 del/del; Zp3-Cre-Tier nicht mehr zu detektieren war (Abb. 18B). Mit Hilfe von Western Blot-Experimenten wurden die Proteinmengen in den Organen der beiden Tiere verglichen. Usp28 war in allen untersuchten Organen (mit Ausnahme des Knochenmarks, wo kein Signal erkennbar war) des Zp3-Cre-Tieres deutlich reduziert. Für das Myc-Protein war es, ähnlich wie bei den Untersuchungen zum CreER^{T2}-vermittelten *Knockout* (Abschnitt 6.2.3), schwierig, die korrekte Bande zu identifizieren, da oberhalb und unterhalb der mutmaßlichen Myc-Bande prominente unspezifische Banden detektiert wurden. Wiederum ist davon auszugehen, dass es keinen deutlichen Unterschied in der Menge an Myc-Protein in den Organen des Usp28-profizienten und -defizienten Tieres gibt (Abb. 18C).



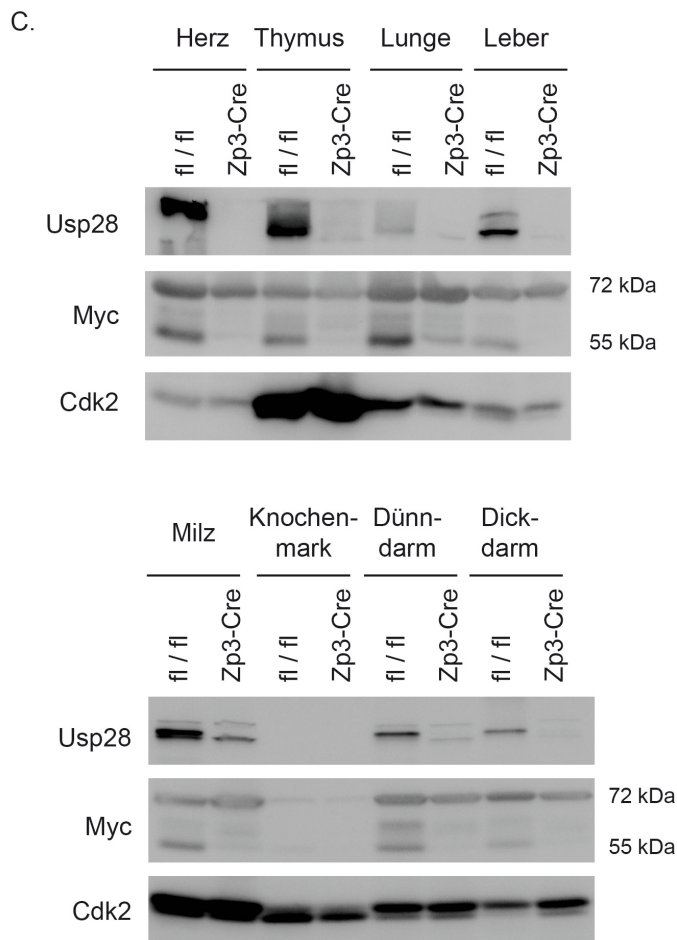


Abb. 18: Die Keimbahndeletion von Usp28 durch Zp3-Cre ist in allen untersuchten Organen vollständig, führt allerdings zu keinem deutlichen Effekt auf die Myc-Proteinmenge

- (A) Die Keimbahndeletion von Usp28 durch Zp3-Cre führt zur vollständigen Deletion von Usp28 in allen untersuchten Organen. Je eine Kontrollmaus (Usp28 fl/fl) und eine Usp28 del/del; Zp3-Cre-Maus wurde getötet, Organproben entnommen, genomische DNA isoliert und Genotypisierungs-PCRs durchgeführt.
- (B) Auch auf RNA-Ebene ist die vollständige Deletion von Usp28 nachweisbar. Aus den Organproben wurde Gesamt-RNA extrahiert und daraus cDNA hergestellt. Die Expressionslevel von *Usp28* wurden durch qRT-PCR bestimmt und als Mittelwerte +SD (n=3) dargestellt. Dafür wurden Primer verwendet, die in der rekombinierten Region binden.
- (C) Auf Proteinebene ist die Reduktion an Usp28 zu erkennen, jedoch kein deutlicher Einfluss auf die Myc-Proteinmengen nachweisbar. Aus den Organproben wurden Proteinextrakte hergestellt und im Western Blot mit Antikörpern gegen Usp28 und Myc untersucht. Cdk2 diente als Ladekontrolle.

6.2.8 Charakterisierung von murinen embryonalen Fibroblasten mit Zp3-Cre-vermittelter Usp28-Deletion

Um die Auswirkungen eines konstitutiven, Zp3-Cre-vermittelten Usp28-Knockouts in einem Zellkultursystem untersuchen zu können, wurden murine embryonale Fibroblasten aus Embryonen am Tag 13,5 der Embryonalentwicklung isoliert. Es wurden MEFs aller

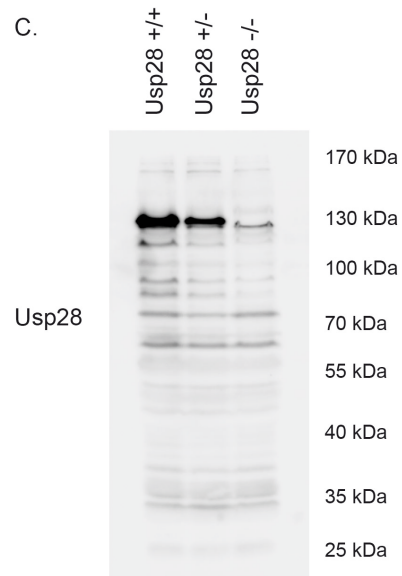
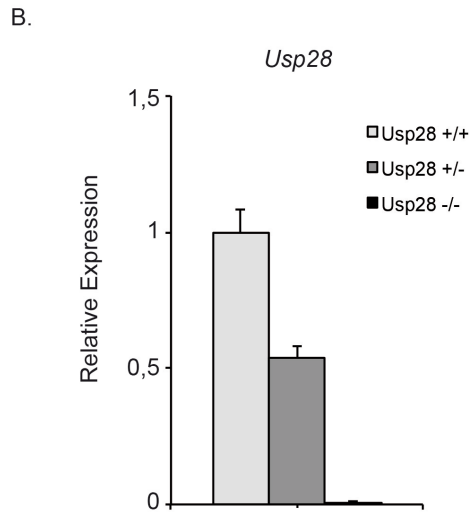
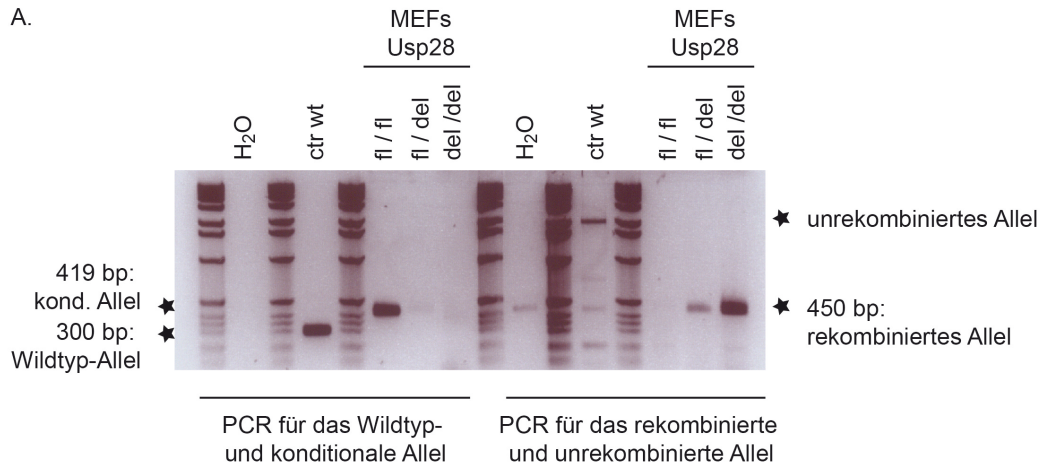
drei möglichen Genotypen miteinander verglichen (Usp28 +/+, Usp28 +/- und Usp28 -/-) und durch Genotypisierungs-PCRs verifiziert (Abb. 19A).

Die qRT-PCR-Analyse zeigte, dass die *Usp28*-mRNA linear mit dem Verlust jedes Allels abnimmt, also in den heterozygoten MEFs um 50 % reduziert ist und in den homozygot-deletierten MEFs nicht mehr nachweisbar ist (Abb. 19B).

Die Cre-vermittelte Rekombination führt zur Deletion von Exon 4 und 5 sowie zu einer Verschiebung des Leserasters in den folgenden Exons. Dies sollte zum Kettenabbruch bei der Translation führen. Um nachzuprüfen, ob die verbleibende Sequenz ausreicht, um ein carboxy-terminal verkürztes Usp28-Protein entstehen zu lassen, wurde Lysat von MEFs mit verschiedenem Usp28-Status im Western Blot untersucht, indem eine vollständige Membran mit dem Usp28-Antikörper inkubiert wurde. Zur Herstellung des polyklonalen Kaninchenantikörpers wurde ein Peptid mit den ersten 350 Aminosäuren von Usp28 verwendet. Somit sollte dieser Antikörper also auch ein amino-terminales Fragment erkennen können. Das vollständige Usp28-Protein besitzt 1077 Aminosäuren und ist 135 kDa groß. Weder im heterozygoten, noch im homozygoten *Usp28-Knockout* ist ein verkürztes Usp28-Protein nachweisbar (Abb. 19C). Es ist also davon auszugehen, dass die nach der Rekombination verbleibende Usp28-Sequenz nicht zur Synthese eines stabilen, kürzeren Fragmentes führt.

Um festzustellen, welche Auswirkungen die Usp28-Deletion auf die Proteinmengen in den MEFs hat, wurden Western Blot-Untersuchungen vorgenommen. Konsistent mit der mRNA-Menge zeigt auch das Usp28-Protein eine lineare Reduktion mit dem Verlust jedes Allels. Die Mengen einiger beschriebener Usp28-Zielproteine wie Myc, Zyklin E und SREBP1 war in allen drei Zelllinien unverändert. Allerdings wiesen die Zellen mit dem heterozygoten Usp28-Verlust erhöhte Mengen an 53BP1 und p19^{ARF} auf. Die erhöhte Menge an p19^{ARF} ist konsistent mit einem seneszenten Phänotyp. 53BP1 (*p53 binding protein 1*) ist ein sogenannter *checkpoint mediator*. Diese Proteine dienen als Gerüste, um bei DNA-Schäden Proteinkinasen wie ATM und ihre Substrate zusammenzubringen (zusammengefasst in (Bakkenist and Kastan, 2004)). Eine Onkogen-induzierte Seneszenz kann als DNA-Schadens-Antwort auftreten (Bartkova et al., 2006). Die Menge an phospho-S62-Myc war hingegen in den Usp28 +/- MEFs reduziert (Abb. 19D).

Ein Cycloheximid-Experiment mit den Usp28-profizienten und -defizienten MEFs zeigte auch nach 5 Stunden wiederum keinen Abbau von Myc oder Zyklin E (Abb. 19E).



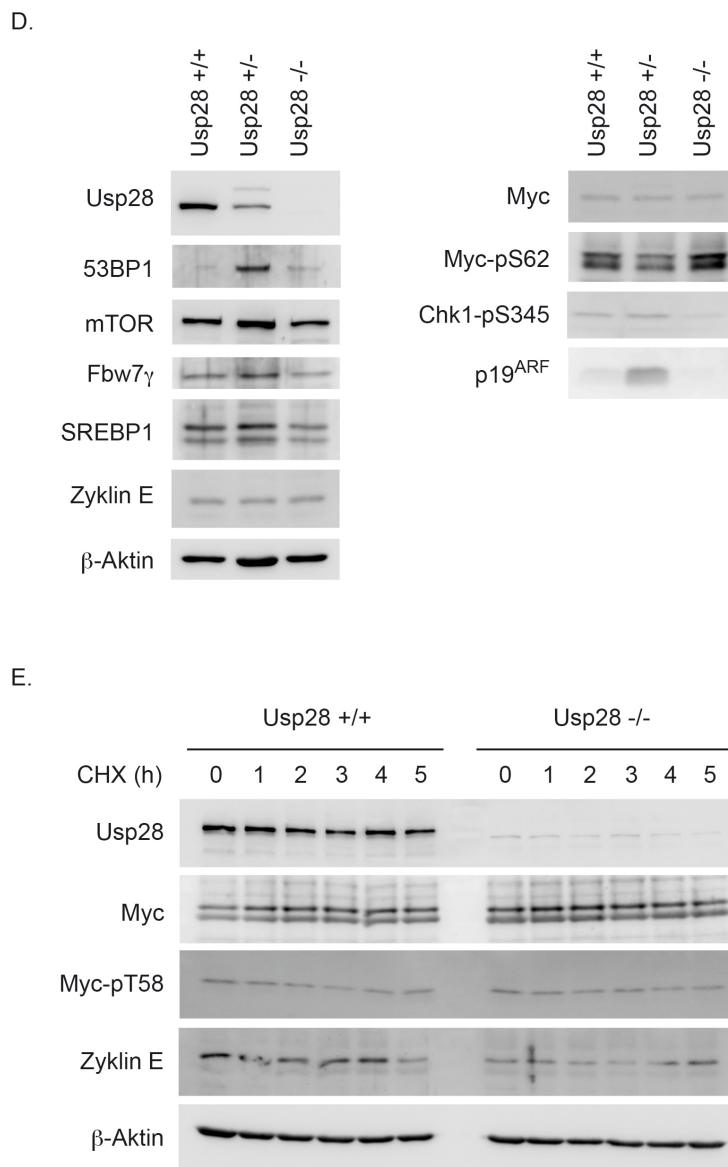


Abb. 19: Charakterisierung von murinen embryonalen Fibroblasten mit Zp3-Cre-vermittelter Usp28-Deletion

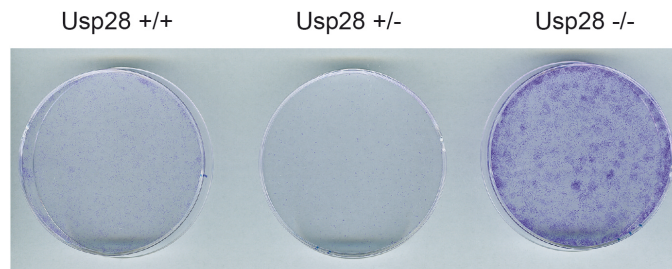
- (A) Genotypisierungs-PCRs zur Validierung der Genotypen der MEFs. Aus primären MEFs wurde genomische DNA isoliert und Genotypisierungs-PCRs durchgeführt. Die Usp28 fl/fl-MEFs besitzen nur das gefloxtete Allel, die Usp28 fl/del-MEFs sowohl das gefloxtete (in dieser PCR nur schwach zu erkennen) und das rekombinierte Allel, die Usp28 del/del-MEFs besitzen nur das rekombinierte Allel.
- (B) Die Menge an *Usp28*-mRNA nimmt mit dem Verlust der Allele linear ab. Aus den primären MEFs wurde Gesamt-RNA extrahiert und daraus cDNA hergestellt. Die Expressionslevel von *Usp28* wurden durch qRT-PCR bestimmt und als Mittelwerte +SD (n=3) dargestellt. Dafür wurden Primer verwendet, die in der rekombinierten Region binden.
- (C) Die Rekombination von Usp28 führt nicht zur Entstehung eines verkürzten Usp28-Proteins. Aus primären MEFs wurde Proteinlysate hergestellt und im Western Blot mit einem Antikörper gegen Usp28 analysiert.
- (D) Die Usp28-Proteinmenge sinkt linear mit dem Verlust der Usp28-Allele, auf die Level an Substratproteinen ist kein Einfluss nachweisbar. Proteinlysate aus primären MEFs wurden im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. β-Aktin diente als Ladekontrolle.
- (E) In den Usp28 fl/fl- und Usp28 del/del-MEFs kann im Cycloheximid Assay kein Abbau von Myc und Zyklin E nachgewiesen werden. Die MEFs wurden mit Cycloheximid (100 µg/ml) inkubiert, um die

Proteinneusynthese zu inhibieren. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert.

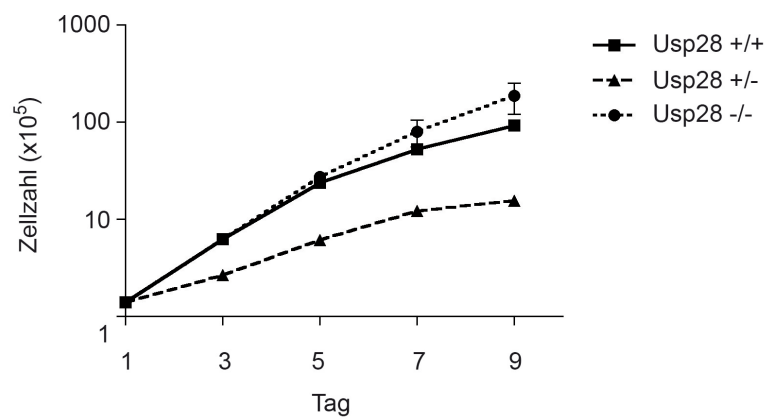
6.2.9 Murine embryonale Fibroblasten mit heterozygotem, konstitutivem Usp28-Knockout weisen einen Proliferationsdefekt und eine veränderte Morphologie auf

Um das Proliferationsverhalten der Zellen zu untersuchen, wurde sowohl eine Kristallviolett-Färbung (Abb. 20A), als auch eine Wachstumskurve (Abb. 20B) erstellt. Dabei zeigte sich, dass die Zellen mit der heterozygoten Usp28-Deletion eine verringerte Proliferationsrate im Vergleich zu den Zelllinien der anderen beiden Genotypen aufwiesen, während die Zellen mit der homozygoten Usp28-Deletion sogar noch schneller proliferierten als die Wildtyp-Zellen. Die mikroskopische Untersuchung der Zellen zeigte eine veränderte Morphologie der primären Usp28 +/- MEFs. Im Vergleich zu den beiden homozygoten Zelllinien zeigten die heterozygoten MEFs flache, stark vergrößerte Zellen mit langen Zellausläufern (Abb. 20C). Diese Morphologie deutet auf einen seneszenten Phänotyp hin. Daher wurde eine Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Färbung durchgeführt. SA- β -Gal ist ein Biomarker für seneszente Zellen, da dieses Enzym spezifisch in seneszenten Zellen akkumuliert und durch die Spaltung eines chromogenen Substrats eine Blaufärbung erzeugt. Die Usp28 +/- MEFs zeigen in derselben Passage eine stärkere Blaufärbung als die beiden homozygoten Zelllinien (Abb. 20D). Daraus kann geschlossen werden, dass die MEFs mit heterozygoter Usp28-Deletion im Vergleich zu Usp28 +/+ und Usp28 -/- MEFs früher seneszent werden.

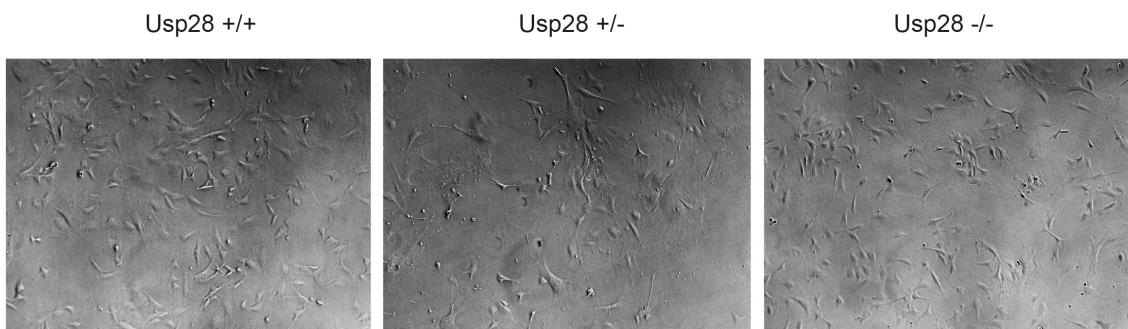
A.



B.



C.



D.

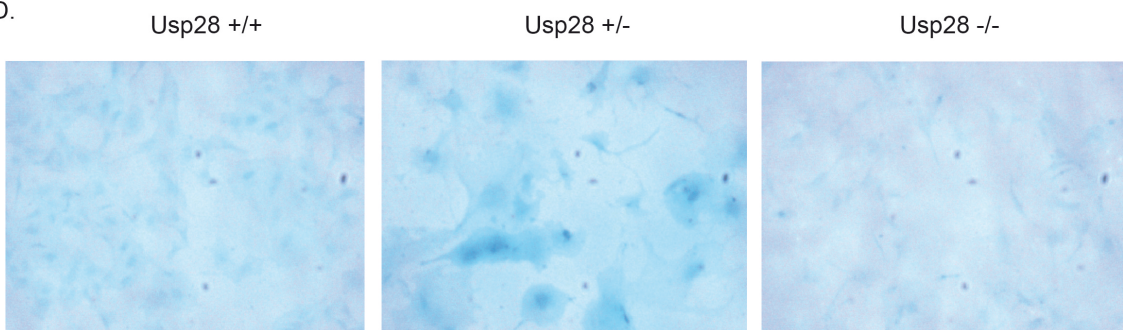


Abb. 20: Murine embryonale Fibroblasten mit heterozygotem, konstitutivem Usp28-Knockout weisen einen Proliferationsdefekt und eine veränderte Morphologie auf

- (A) MEFs mit heterozygoter Usp28-Deletion proliferieren langsamer als MEFs mit zwei geflochten oder zwei rekombinierten Usp28-Allelen. Jeweils 10.000 Zellen wurden auf eine 6 cm-Schale ausplattiert. Nach 10 Tagen wurden die Zellen durch Kristallviolett-Färbung visualisiert.
- (B) Primäre MEFs der drei verschiedenen Usp28-Genotypen wurden in gleicher Zellzahl in Triplikaten ausplattiert und alle zwei Tage gezählt. Aus den Werten wurde eine kumulative Wachstumskurve erstellt.
- (C) Primäre MEFs mit heterozygoter Usp28-Deletion weisen eine veränderte Morphologie auf. Die Zellen wurden in gleicher Zellzahl ausplattiert. Nachdem sich die Zellen innerhalb von 24 Stunden abgesetzt hatten, wurden mikroskopische Aufnahmen gemacht.
- (D) MEFs mit heterozygoter Usp28-Deletion werden früher seneszent. Primäre MEFs wurden in gleicher Zellzahl ausplattiert und eine SA- β -Gal-Färbung durchgeführt.

6.2.10 Der Einfluss der Usp28-Deletion auf die Myc-abhängige Tumorentstehung

6.2.10.1 Das E μ -Myc-Lymphom-Modell

Der Transkriptionsfaktor Myc spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Vielzahl humaner Tumore. Nach dem Konzept der „*oncogene addiction*“ bleiben Tumore abhängig von dem initiiierenden onkogenen Signalweg (Luo et al., 2009; Weinstein, 2002), also zum Beispiel von konstant hohen Leveln an Myc-Protein. Die Hemmung von Proteinen, die für die Erhaltung der Myc-Funktion wichtig sind, stellt einen interessanten Ansatzpunkt für die Therapie Myc-induzierter humaner Tumore dar. Somit könnte die Hemmung von Usp28 zu einer Destabilisierung von Myc und einem Rückgang der Tumore führen. Als Modell zur Untersuchung dieser Theorie diente das transgene E μ -Myc-Lymphom-Mausmodell (Adams et al., 1985; Harris et al., 1988). Das E μ -Myc-Transgen entspricht der t(8;14)-Translokation, die häufig in humanen Burkitt-Lymphomen vorliegt. Diese chromosomale Translokation bringt Myc unter die Kontrolle der regulatorischen Sequenzen der schweren Immunglobulinkette (Abb. 21). Dadurch kommt es zu einer konstitutiven, hohen Myc-Expression in B-Zellen und zur Entstehung eines B-Zell-Lymphoms. Diese B-Zell-Lymphome treten bei den E μ -Myc-Mäusen spontan innerhalb weniger Monate auf. Erste Anzeichen der Erkrankung sind dabei tastbare Vergrößerungen der zervikalen, axillären und inguinalen Lymphknoten, sowie allgemeine Krankheitsanzeichen (gekrümmte Körperhaltung, verlangsamte Bewegungen, gesträubtes Fell, gesteigerte Atemfrequenz). Der zeitliche Verlauf der Erkrankung variiert dabei deutlich zwischen den einzelnen Individuen, sowohl was das Alter bei Auftreten der ersten Anzeichen betrifft, als auch die Geschwindigkeit des Krankheitsverlaufs bis hin zu terminaler Erkrankung und Tod (Harris et al., 1988).

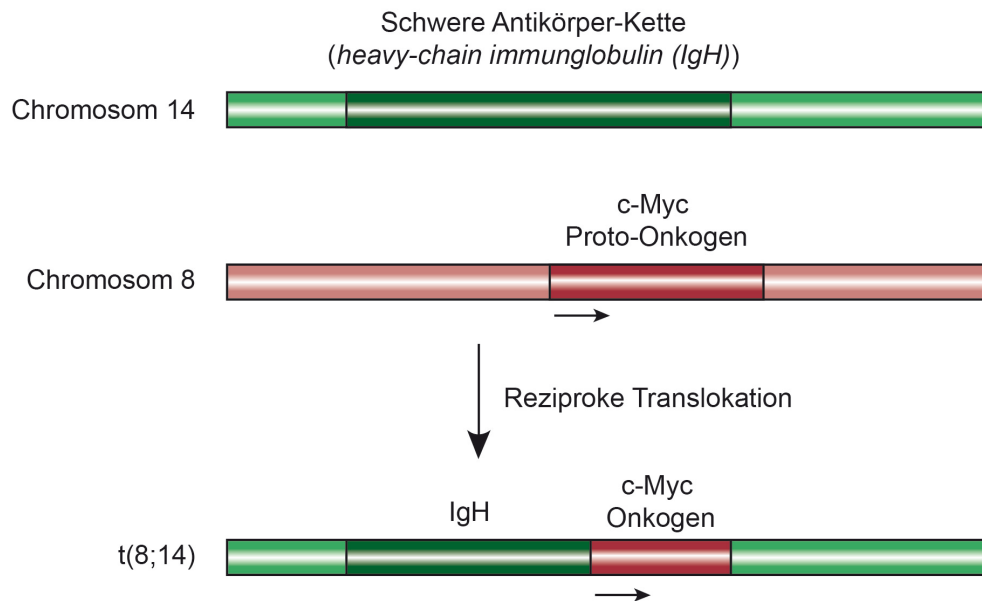


Abb. 21: Die chromosomale Translokation im Burkitt-Lymphom und im E μ -Myc-Mausmodell

Schematische Darstellung der reziproken Translokation zwischen der schweren Antikörper-Kette auf Chromosom 14 und dem c-Myc Proto-Onkogen auf Chromosom 8, wie sie in humanen Burkitt-Lymphomen gefunden wird. Diese Translokation wird auch im E μ -Myc-Mausmodell verwendet um ein Myc-abhängiges B-Zell-Lymphom auszulösen (angelehnt an (Weinberg, 2007)).

Um sicherzustellen, dass Usp28 im lymphatischen System exprimiert wird, wurde eine Usp28 fl/fl; E μ -Myc-Maus getötet und Tumorgewebe (aus vergrößerten Lymphknoten und vergrößerter Milz) entnommen und zur Proteinextraktion verwendet. Im Western Blot zeigte sich, dass Usp28 in beiden Tumorgeweben exprimiert war. Im Vergleich zu dem zur Kontrolle aufgetragenen Lysat aus MEFs zeigten die Tumorproben wie erwartet erhöhte Mengen an Myc-Protein (Abb. 22A). Um festzustellen, ob eine akute Usp28-Deletion in diesem System möglich ist, wurden B-Zellen aus einem Tumor einer Usp28 fl/fl; CreER^{T2}; E μ -Myc-Maus isoliert und in Kultur mit 4-OHT behandelt. Sowohl im Western Blot (Abb. 22B) als auch in der qRT-PCR (Abb. 22C) ist die effiziente Deletion von Usp28 sichtbar.

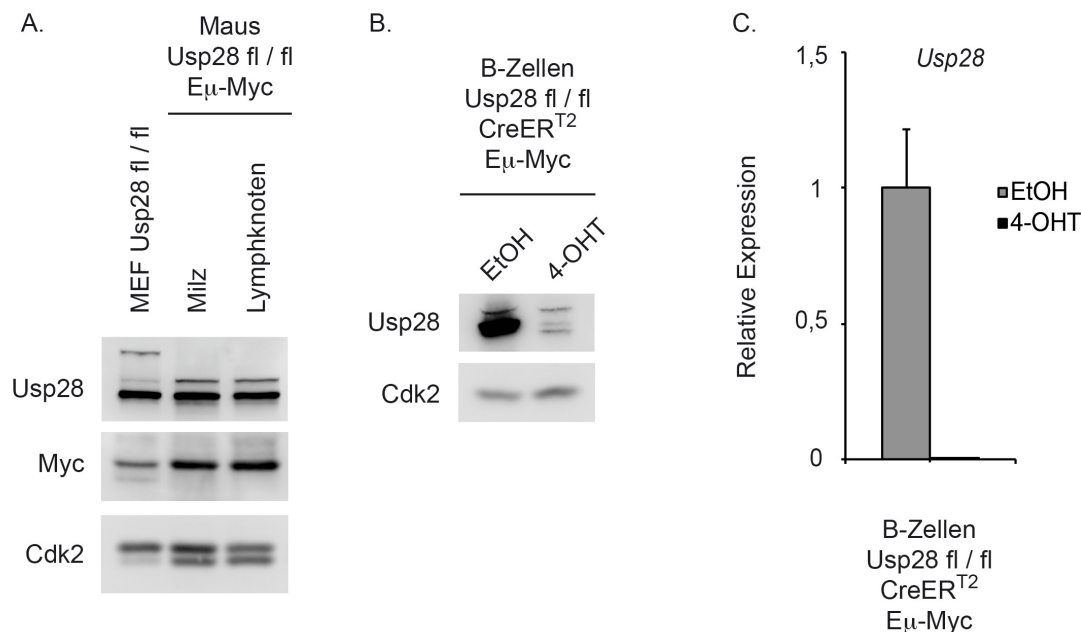


Abb. 22: Usp28 ist im lymphatischen System exprimiert und kann in isolierten B-Zellen akut deletiert werden

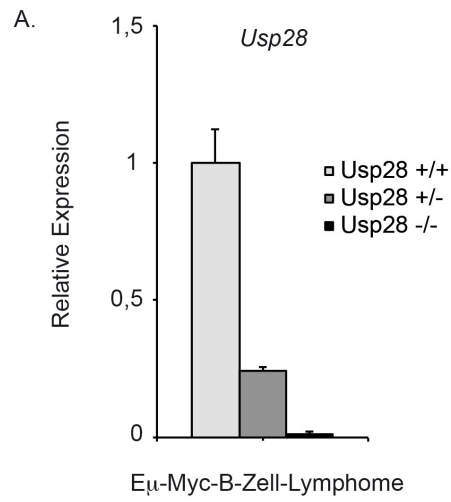
- (A) Eine Usp28 fl/fl; Eμ-Myc-Maus mit einem Lymphom wurde getötet und Tumormaterial aus Lymphknoten und Milz entnommen. Daraus wurde Proteinlysat hergestellt und im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern untersucht.
- (B) Eine Usp28 fl/fl; CreER^{T2}; Eμ-Myc-Maus mit Lymphom wurde getötet und B-Zellen aus dem Tumormaterial isoliert. Diese wurden in Kultur mit 4-OHT behandelt, Proteinlysate hergestellt und im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert.
- (C) Aus B-Zellen behandelt wie in 22B wurde Gesamt-RNA extrahiert und daraus cDNA hergestellt. Die Expressionslevel von *Usp28* wurden durch qRT-PCR bestimmt und als Mittelwerte +SD (n=3) dargestellt. Dafür wurden Primer verwendet, die in der rekombinierten Region binden.

6.2.10.2 Eμ-Myc-Lymphome von Tieren mit heterozygotem Usp28-Knockout zeigen eine Tendenz zu niedrigeren Myc-Proteinleveln

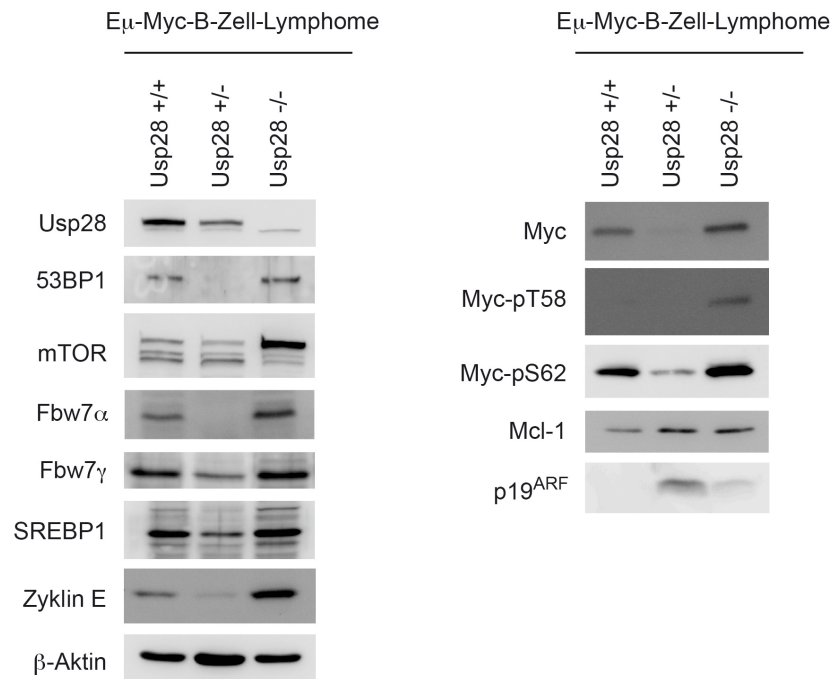
Um den Einfluss der Usp28-Deletion auf die Entstehung und den Verlauf der Eμ-Myc-Lymphome untersuchen zu können, wurden Mauslinien gezüchtet, die das Eμ-Myc-Transgen exprimieren und entweder beide Allele von Usp28 besitzen (Usp28 +/+), heterozygot für Usp28 sind (Usp28 +/-) oder homozygot deletiert sind (Usp28 -/-). Zur Zucht wurden immer nur Eμ-Myc-Männchen verwendet, da bei Weibchen die Gefahr zu groß ist, dass sie erkranken oder sterben, solange sie die Jungtiere noch säugen. Sobald bei einem Tier ein Tumor auftrat, wurde es durch zervikale Dislokation getötet und Tumorgewebe für weitere Untersuchungen entnommen. Die Analyse der RNA aus Tumoren der drei verschiedenen Usp28-Genotypen zeigte einen linearen Rückgang der

Usp28-mRNA bei Deletion eines jeden Allels (Abb. 23A). Ebenso wurde routinemäßig aus den entnommenen Tumoren DNA isoliert und in Genotypisierungs-PCRs untersucht. Im Vergleich zur DNA aus der entsprechenden Schwanzbiopsie konnte nie eine Veränderung des Genotypes festgestellt werden (nicht gezeigt), sodass in heterozygoten Tieren eine Selektion gegen das verbliebene Allel (*loss of heterozygosity*, LOH, (Knudson, 1971)) unwahrscheinlich ist.

Die Analyse der Proteinmengen von Tumoren der verschiedenen Genotypen zeigte ebenso den linearen Rückgang an *Usp28*-Protein. Eine interessante Beobachtung ist auch, dass in den Tumorproben von heterozygoten Tieren kaum noch *Fbw7 α* -Protein nachweisbar ist. *Fbw7 γ* hingegen ist im Vergleich zu den anderen beiden Genotypen nur reduziert, aber noch nachweisbar (Abb. 23B). Bei den Mengen der untersuchten Substratproteine gab es eine gewisse Variabilität zwischen verschiedenen Tumoren desselben Genotyps, allerdings ließ sich eine Tendenz feststellen: In den Tumoren von Mäusen, die heterozygot für *Usp28* waren, wurden oft drastisch reduzierte Mengen an *Usp28*-Substratproteinen gefunden (Abb. 23B und C). So waren 53BP1, SREBP1, Zyklin E und Myc deutlich schwächer in *Usp28*^{+/-} Tumoren exprimiert als in *Usp28*^{+/+} oder *Usp28*^{-/-} Tumoren. Dies ist konsistent mit dem verringerten Wachstum und der seneszenten Morphologie der MEFs dieses Genotyps (siehe Abschnitt 6.2.9). Allerdings wurden auch Tumore von heterozygoten Tieren gefunden, in denen sich die Level an Myc und Zyklin E nicht von den beiden homozygoten Genotypen unterscheiden (Abb. 23D). Um einen globaleren Eindruck der Myc-Level in Tumoren mit unterschiedlichem *Usp28*-Status zu bekommen, wurden 12 Tumorproben aus Lymphknoten bzw. Milz nebeneinander auf einem Gel verglichen (Abb. 23E). Dabei zeigte sich, dass es eine gewisse Variabilität zwischen einzelnen Individuen gibt, dass aber dennoch eine Tendenz zu niedrigeren Myc-Levels in Tumoren heterozygoter Tiere für *Usp28* festgestellt werden kann.



B.



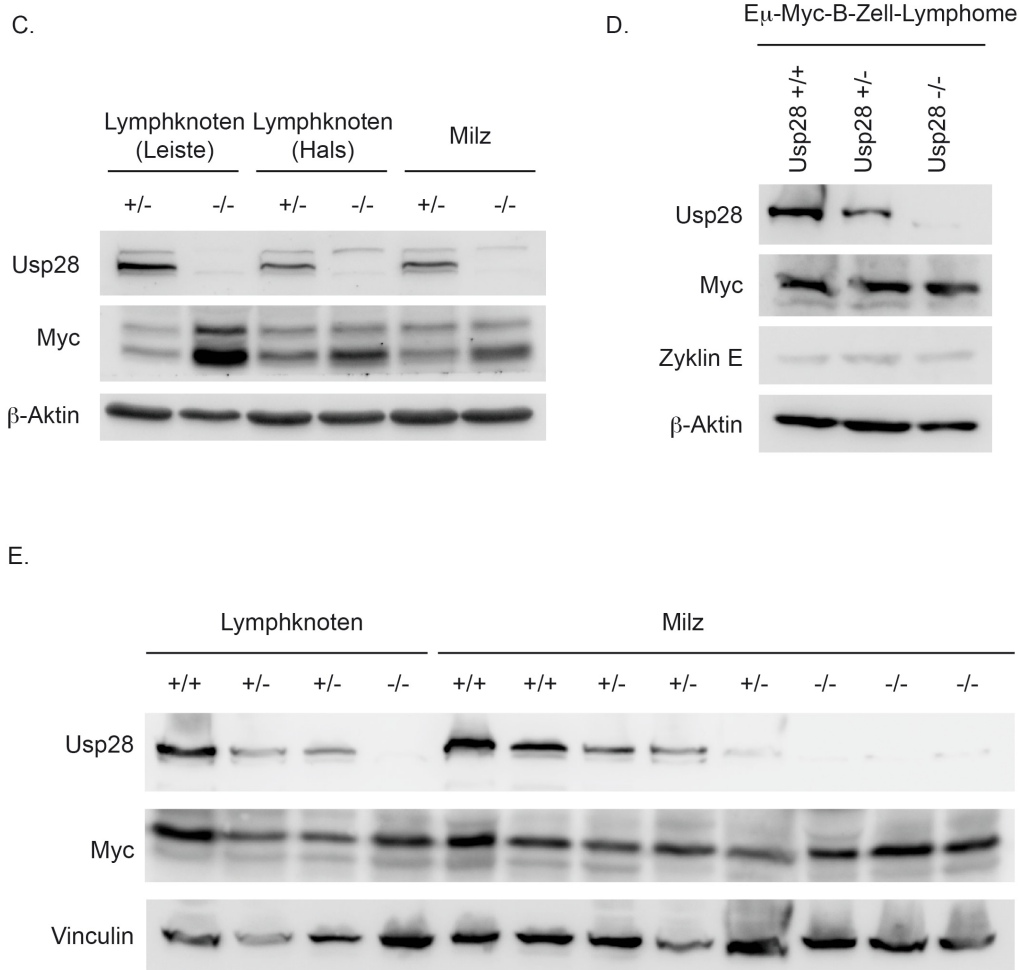


Abb. 23: E_μ-Myc-Lymphome von Tieren mit heterozygotem Usp28-Knockout zeigen eine Tendenz zu niedrigeren Myc-Proteinleveln

- (A) In den E_μ-Myc-Tumoren der Tiere der verschiedenen Usp28-Genotypen sinkt die *Usp28*-mRNA-Menge linear mit der Deletion eines jeden Allels. Lymphome wurden isoliert, Gesamt-RNA extrahiert und daraus cDNA hergestellt. Die Expressionslevel von *Usp28* wurden durch qRT-PCR bestimmt und als Mittelwerte +SD (n=3) dargestellt. Dafür wurden Primer verwendet, die in der rekombinierten Region binden.
- (B) Tumore von Mäusen mit heterozygoter Usp28-Deletion zeigen tendenziell niedrigere Mengen an Myc und anderen Usp28-Substraten. Aus isolierten Tumoren wurden Proteinextrakte hergestellt und im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern untersucht. β-Aktin diene als Ladekontrolle.
- (C) Tumore von verschiedenen Lokalisationen (Leiste, Hals, Milz) einer Usp28 +/- und einer Usp28 -/- Maus wurden isoliert, Proteinlysate hergestellt und im Western Blot mit den angegebenen Antikörpern miteinander verglichen. β-Aktin diene als Ladekontrolle.
- (D) und (E) Wie in 23B wurden Proteinlysate aus Tumoren der verschiedenen Genotypen im Western Blot miteinander verglichen. β-Aktin bzw. Vinculin diene als Ladekontrolle.

6.2.10.3 E μ -Myc-Tiere mit heterozygotem Usp28-Knockout zeigen eine längere tumorfreie Überlebenszeit

Niedrigere Mengen an Myc-Protein könnten einen Einfluss auf die Tumorentstehung dieser Myc-abhängigen Lymphome haben. Daher wurde aus der tumorfreien Überlebenszeit der Mäuse der verschiedenen Genotypen eine Überlebenskurve erstellt (Abb. 24). Die Kurve zeigt, dass die Usp28^{+/-}; E μ -Myc-Tiere die längste mittlere Überlebenszeit aufweisen (19 Wochen), was gegenüber den Usp28^{+/+}; E μ -Myc-Tieren (14,5 Wochen) signifikant länger ist.

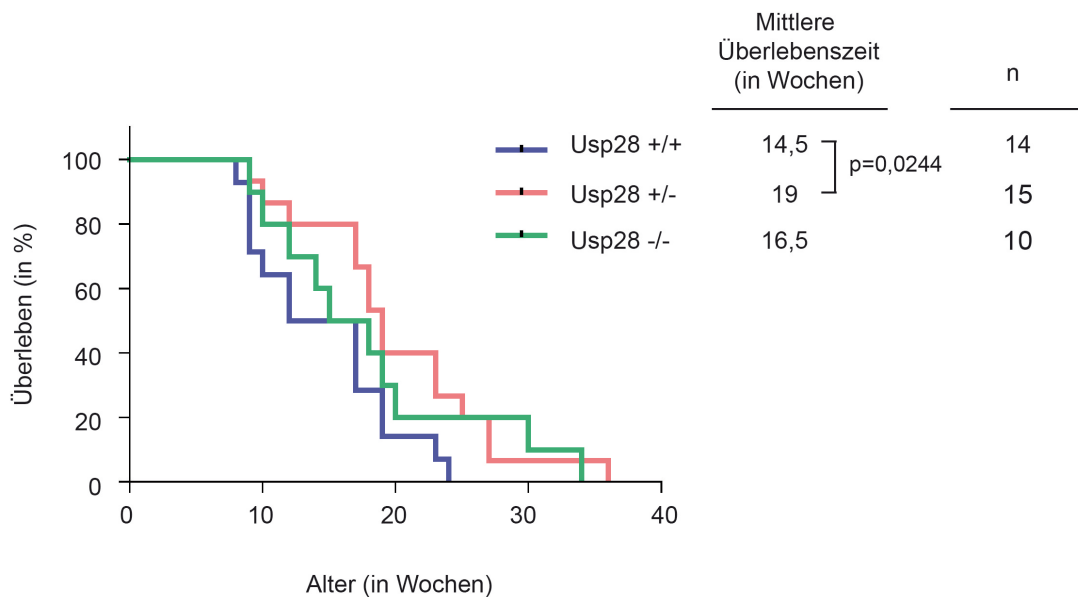


Abb. 24: Usp28^{+/-}; E μ -Myc-Tiere entwickeln ihre Lymphome signifikant später als Usp28^{+/+}; E μ -Myc-Tiere

E μ -Myc-Tiere mit verschiedenem Usp28-Status wurden beim Auftreten von Anzeichen eines Lymphoms (Schwellung der Lymphknoten, allgemeine Krankheitsanzeichen) getötet und Tumorproben für verschiedene Analysen entnommen. Das Alter der Tiere bis zum Auftreten der Tumore wurde in einer Überlebenskurve dargestellt.

7 Diskussion

7.1 Die Regulation von Fbw7 durch eine PI3K-abhängige Phosphorylierung

7.1.1 Posttranslationale Modifikationen, die die Fbw7-Aktivität regulieren

Der bisher am besten untersuchte Mechanismus, über den der Abbau von Zielproteinen der E3-Ligase Fbw7 reguliert wird, ist die Phosphorylierung der CPD (Cdc4-Phospho-Degron)-Motive in den Substraten. Auch die Fbw7-Dimerisierung ist eine Möglichkeit, die Effizienz der Fbw7-vermittelten Ubiquitinierung zu erhöhen.

Darüberhinaus sind weitere posttranslationale Modifikationen beschrieben worden, die die Aktivität von Fbw7 beeinflussen. Zum Beispiel wurde beobachtet, dass sich die Interaktion zwischen Fbw7 und Usp28 nach DNA-Schaden löst, was zum verstärkten Abbau von Myc führt (Popov et al., 2007a). Es konnte auch gezeigt werden, dass Fbw7 nach DNA-Schaden ATM/ATR-abhängig phosphoryliert wird (Matsuoka et al., 2007). Dies ist ein Weg, wie intrazelluläre Stresssignale Einfluss auf den Fbw7-vermittelten Myc-Abbau haben können.

Eine weitere posttranslationale Modifikation von Fbw7 stellt die Phosphorylierung durch die Kinase PKC dar. PKC phosphoryliert spezifisch die α -Isoform von Fbw7, was deren nukleäre Lokalisation reguliert (Durgan and Parker, 2010).

7.1.2 Serin 227 in Fbw7 liegt in einer Konsensussequenz für AGC-Kinasen

Ziel dieser Arbeit war es, weitere posttranslationale Modifikationen an Fbw7 zu finden, die den Abbau von Fbw7-Substraten regulieren, ergänzend zu der gut untersuchten Phosphorylierung der Substrate an ihren Cdc4-Phospho-Degrone. Deshalb wurde in der Aminosäuresequenz von Fbw7 nach bekannten Konsensussequenzen für die Phosphorylierung durch Proteinkinasen gesucht. Das bioinformatische Programm Scansite erkannte die Sequenz um Serin 227 (**RRRIT₂₂₇S**) als Konsensussequenz für die Akt/PKB-Kinase. Die Sequenz **RxRxxS/T** (wobei x jede proteinogene Aminosäure sein kann) wird jedoch nicht nur von Akt phosphoryliert, sondern stellt das Konsensusmotiv für die Familie der AGC-Kinasen (auch Arginin-gerichtete Kinasen genannt) dar, einer Untergruppe von Serin/Threonin-Kinasen, die in ihrer katalytischen Domäne eine hohe Sequenzhomologie zu den Kinasen PKA, PKG und PKC aufweisen. Mitglieder der AGC-

Kinase-Familie sind unter anderem Akt, S6K, PDK1, SGK1 und LATS (Pearce et al., 2010).

7.1.3 Fbw7 wird PI3K-abhängig an Serin 227 phosphoryliert

Um zu untersuchen, ob Serin 227 in Fbw7 *in vivo* phosphoryliert wird, wurde der phospho-Akt-Substrat-Antikörper von Cell Signaling verwendet, der ein phosphoryliertes Serin oder Threonin in der Akt-Konsensussequenz erkennt, jedoch keine Kreuzreaktivität mit der unphosphorylierten Sequenz zeigt. Zellen wurden mit FLAG-Fbw7 transfiziert, unter denaturierenden Bedingungen lysiert und eine Immunpräzipitation mit FLAG-Antikörpern durchgeführt. Durch die denaturierende Lyse wird verhindert, dass Fbw7-interagierende Proteine mitpräzipitiert, und im Western Blot mit dem phospho-Akt-Substrat-Antikörper erkannt werden. Auf diese Weise ist sichergestellt, dass das phospho-Akt-Substrat-Signal von Fbw7 herrührt (Abb. 6B, C, D). Um zu überprüfen, ob wirklich Serin 227 phosphoryliert vorliegt, wurde eine Punktmutante verwendet, in der das Serin zu einem nicht phosphorylierbaren Alanin mutiert wurde. Da das Fbw7-Wildtyp-Protein vom phospho-Akt-Substrat-Antikörper erkannt wurde, die S227A-Mutante jedoch nicht, kann angenommen werden, dass Serin 227 in Fbw7 *in vivo* phosphoryliert wird (Abb. 6B, C, D). Den Kinasen der AGC-Familie ist neben der Konsensussequenz auch die Regulation durch PI3K-abhängige Signalwege gemein. Die Hemmung von PI3K durch die etablierten Inhibitoren LY290024 und BEZ235 verhindert die Phosphorylierung von Fbw7 (Abb. 6C, D), was darauf hindeutet, dass PI3K-nachgeschaltete Signalwege für die Serin 227-Phosphorylierung verantwortlich sind.

7.1.4 Die Kinase für die Phosphorylierung von Fbw7 ist nicht Akt

Nachdem festgestellt wurde, dass Serin 227 in Fbw7 *in vivo* phosphoryliert wird, stellte sich die Frage nach der verantwortlichen Kinase. Da Serin 227 in einer Akt-Konsensussequenz liegt, wurden *in vitro* Phosphorylierungsexperimente mit rekombinanter Akt-Kinase durchgeführt (Abb. 7). Das in der Literatur als Akt-Substrat beschriebene FoxO3a-Protein wurde als Positivkontrolle eingesetzt und wurde *in vitro* von Akt phosphoryliert, womit sichergestellt werden konnte, dass das Experiment funktioniert hat. Auch die Autophosphorylierung von Akt (Li et al., 2006) konnte in manchen Experimenten nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Daraus wurde geschlossen, dass

Serin 227 nicht von Akt, sondern von einer anderen Kinase der AGC-Familie mit gleicher Konsensussequenz und Regulation durch PI3K phosphoryliert wird. Um die Kinase(n) zu finden, die für die Phosphorylierung von Serin 227 in Fbw7 verantwortlich ist (sind), bietet sich eine shRNA-basierte Hochdurchsatzanalyse an. Mittels kommerziell erhältlicher shRNA-Bibliotheken gegen humane Kinasen (Bernards et al., 2006) (oder eine Auswahl daraus bestehend aus Sequenzen gegen Kinasen der AGC-Familie) können Zellen infiziert und so die Expression der Kinasen gehemmt werden. Durch Immunfluoreszenz könnten Substratproteine von Fbw7 (z. B. Myc) quantifiziert und so die Kinasen identifiziert werden, die Einfluss auf die Aktivität von Fbw7 haben. Dabei werden natürlich viele Kinasen gefunden werden, deren Einfluss auf die Myc-Menge nicht über die Phosphorylierung von Fbw7 vermittelt wird. Um die Treffer auf Fbw7-Abhängigkeit einzugrenzen, sollte die Analyse parallel in Fbw7-profizienten und -defizienten Zellen durchgeführt werden (HCT116, (Rajagopalan et al., 2004)). So könnte man gezielt die Kinasen weiter analysieren, deren *Knockdown* nur in den HCT116 Fbw7 *+/+* Zellen einen Einfluss auf die Menge an Fbw7-Substratproteinen hat, nicht jedoch in den HCT116 Fbw7 *-/-* Zellen.

7.1.5 Die Phosphorylierung von Serin 227 in Fbw7 beeinflusst sowohl die Stabilität von Fbw7-Substraten, als auch von Fbw7 selbst

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Phosphorylierung von Serin 227 auf die Aktivität von Fbw7 zum Substratabbau hat, wurde die S227A-Punktmutante verwendet, die den konstitutiv unphosphorylierten Zustand darstellt, im Vergleich zum Wildtyp-Fbw7, das den phosphorylierten Zustand repräsentiert.

In Koexpressionsexperimenten von Fbw7 und seinen Substraten Myc oder Zyklin E konnte festgestellt werden, dass die S227A-Mutante nur eine eingeschränkte Fähigkeit zum Substratabbau besitzt, was darauf hindeutet, dass die Phosphorylierung eine Voraussetzung für die volle Funktionsfähigkeit von Fbw7 ist (Abb. 8A). Dies konnte auch in Fbw7-defizienten HCT116-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 8B). In dieser Kolonkarzinomzelllinie wurden alle drei Fbw7-Isoformen durch homologe Rekombination von Exon 5, welches für die F-Box codiert, inaktiviert (Rajagopalan et al., 2004). Daher ermöglicht diese Zelllinie, den Effekt der Fbw7-Mutante ohne den Hintergrund von endogenem Wildtyp-Protein oder anderen Isoformen von Fbw7 zu untersuchen. Die

Proteinlevel von Myc und Zyklin E steigen in den Fbw7-defizienten Zellen im Vergleich zu den parental Zellen stark an und gehen nach Rekonstitution mit Fbw7-WT wieder zurück, mit Fbw7-S227A jedoch nicht in gleichem Maße. Andere publizierte Substrate von Fbw7, wie SREBP1, mTOR und McI1 zeigen jedoch keinerlei Stabilitätsunterschiede in Fbw7-profizienten oder -defizienten Zellen und ändern sich auch nicht nach Expression von Fbw7-WT oder -Mutante. Es könnte sein, dass es sich hier um einen zelllinienspezifischen Effekt handelt. Andererseits wurde die Stabilität dieser Proteine nicht untersucht. Es ist also möglich, dass die Stabilität tatsächlich beeinflusst, aber durch kompensatorische Mechanismen wieder maskiert wird.

Eine weitere Möglichkeit, den Effekt der Phosphorylierung zu untersuchen, wäre die Verwendung einer phosphomimetischen Punktmutante, in der das Serin durch eine saure Aminosäure (Asparaginsäure oder Glutaminsäure) ersetzt ist. Die Carboxylgruppen dieser Aminosäuren können die negative Ladung einer Phosphorylierung nachahmen. Experimente mit einer Fbw7-S227D- oder -S227E-Mutante zeigten jedoch, dass in diesem Fall die phosphomimetischen Punktmutanten nicht in der Lage waren, den phosphorylierten Status adäquat zu imitieren (Daten nicht gezeigt). Ist die Kinase bekannt und existieren Möglichkeiten, deren Aktivität zu stimulieren, so lässt sich der phosphorylierte Zustand durch Stimulation erzeugen oder verstärken.

Die in den Fbw7-Wildtyp-exprimierenden Zellen beobachteten geringeren *steady state* Proteinmengen der Fbw7-Substratproteine können verschiedene Ursachen haben und müssen nicht zwangsläufig durch stärkeren proteasomalen Abbau zustande kommen. Um zu zeigen, dass Fbw7-WT Myc und Zyklin E tatsächlich schneller degradiert als die Mutante, wurden Cycloheximid-Experimente durchgeführt. Da Cycloheximid die Translation inhibiert, kann keine Proteinneusynthese stattfinden und der Abbau der vorhandenen Proteinmenge kann über die Zeit verfolgt werden. In diesen Experimenten zeigte sich, dass Fbw7-WT den Abbau von Myc und Zyklin E tatsächlich schneller fördern kann als Fbw7-S227A (Abb. 8C). Besonders deutlich wird dies auch an der T58-phosphorylierten Fraktion von Myc, die ja spezifisch von Fbw7 gebunden und abgebaut werden kann (siehe Abschnitt 3.5.4). Außerdem konnte durch diese Experimente eine weitere, unerwartete Beobachtung gemacht werden: Auch die Stabilität von Fbw7 selbst wird durch die Mutation beeinflusst. Fbw7-S227A wird schneller abgebaut als die Wildtyp-Form. Die geringere Stabilität der Mutante könnte also zur geringeren Aktivität

gegenüber den Substraten beitragen. Ein beschriebener Mechanismus, über den der Abbau von F-Box-Proteinen reguliert wird, ist die Ubiquitin-abhängige Degradierung durch einen autokatalytischen Prozess. Die Überexpression eines Substrats führt zur Stabilisierung des F-Box-Proteins, ein Mechanismus, der die Mengen von spezifischen F-Box-Proteinen an den Bedarf in einer bestimmten zellulären Situation anpassen kann (Galan and Peter, 1999). Im Umkehrschluss sollten also F-Box-Proteine ihren eigenen Abbau vermitteln, wenn ihre Substrate nicht mehr verfügbar sind. Die weniger stabile Mutante von Fbw7 sollte also ihre Substrate effizienter abbauen können. In den vorliegenden Experimenten wurde jedoch der gegenteilige Effekt festgestellt (Abb. 8A, B und C). Die Phosphorylierung an Serin 227 könnte daher dazu dienen, den Abbau von Substraten und den autokatalytischen Abbau zu entkoppeln, um das Gleichgewicht mehr in Richtung Substratabbau zu verschieben. In *in vivo*-Ubiquitinierungs-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Fbw7-S227A auch in der Ubiquitinierung von Substratproteinen (Myc und Zyklin E) eingeschränkt ist (Abb. 8D). Somit erhöht die Phosphorylierung von Serin 227 die Fähigkeit von Fbw7 zur Ubiquitinierung von Substratproteinen, was mit einer Verringerung der Menge an unmodifiziertem Protein einhergeht.

7.1.6 Die subzelluläre Lokalisation und bekannte Interaktionen von Fbw7 werden nicht von der Phosphorylierung an Serin 227 beeinflusst

Die Phosphorylierung von Serin 227 beeinflusst die Funktion von Fbw7. Die unphosphorylierte Form von Fbw7 kann Substratproteine schlechter ubiquitinieren und abbauen und ist selbst weniger stabil als die potentiell phosphorylierte Wildtyp-Form (Abb. 8).

Es stellt sich die Frage nach der molekularen Ursache für diesen Effekt. Eine Möglichkeit wäre, dass die Phosphorylierung die subzelluläre Lokalisation beeinflusst. Isoform-spezifische regulatorische Sequenzen bestimmen die subzelluläre Lokalisation: Fbw7 α befindet sich vor allem im Nukleus, Fbw7 β im Zytoplasma und Fbw7 γ im Nukleolus (Welcker and Clurman, 2008). Es sind Beispiele bekannt, wie interagierende Proteine und posttranslationale Modifikationen die Lokalisation bestimmter Isoformen beeinflussen. So wird z. B. Fbw7 α im isoformspezifischen Amino-Terminus nahe am nukleären Lokalisierungssignal von der Proteinkinase PKC phosphoryliert, was die Aktivität des nukleären Lokalisierungssignals abschwächt und zur zytoplasmatischen Relokalisation

beitragen kann (Durgan and Parker, 2010). Für die nukleoläre Lokalisation von Fbw7 γ hingegen ist die Interaktion mit dem Pseudosubstrat Ebp2 notwendig (Welcker et al., 2011); ebenso wurde die Interaktion mit Nukleophosmin als entscheidend für die Stabilität und nukleoläre Lokalisation von Fbw7 γ festgestellt (Bonetti et al., 2008).

Immunfluoreszenzuntersuchungen mit Fbw7-Wildtyp und -S227A zeigten keinen Unterschied in der subzellulären Lokalisation dieser beiden Proteine; beide waren im Zellkern lokalisiert, was typisch für die α -Isoform ist (Abb. 9A).

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob bekannte Interaktionen durch die Phosphorylierung von Fbw7 beeinflusst werden. Über die F-Box bindet Fbw7 an Skp1, das Adapterprotein des SCF-Komplexes, welches die weiteren Komponenten des Komplexes rekrutiert (siehe auch Abb. 5). Würde die S227-Phosphorylierung diese Interaktion fördern, so könnte eine nicht phosphorylierbare Mutante von Fbw7 den SCF-Komplex nicht so gut rekrutieren und folglich Substrate nicht so gut ubiquitinieren und degradieren. Immunpräzipitationsexperimente konnten jedoch zeigen, dass sowohl Fbw7-WT als auch Fbw7-S227A mit Skp1 interagieren können (Abb. 9B).

Wie bereits in Abschnitt 3.6.2 beschrieben, kann Fbw7 Homodimere ausbilden, wodurch der Abbau von Substraten mit schwachen CPDs gefördert wird (Tang et al., 2007). Wenn die Phosphorylierung von Serin 227 notwendig für die effiziente Homodimerisierung wäre, könnte das die eingeschränkte Funktion der Mutante erklären. Jedoch konnte gezeigt werden, dass sowohl Fbw7-WT als auch Fbw7-S227A in der Lage ist, Fbw7-Wildtyp zu binden (Abb. 9C). Eine bekannte dimerisierungsdefiziente Mutante von Fbw7 (LI265EE) hingegen konnte dies nicht. Darüberhinaus hemmt die S227A-Mutation weder die Interaktion mit Usp28, noch die Fähigkeit von Fbw7 zur Substratbindung (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurde nicht untersucht, ob Fbw7-S227A Homodimere bilden kann. Dazu müssten die Experimente in Fbw7-defizienten HCT116-Zellen wiederholt werden, um Effekte von endogenem Fbw7-WT auszuschließen. Weitere Möglichkeiten, um zu überprüfen, ob Interaktionen phosphorylierungsabhängig sind, wäre die Durchführung von Immunpräzipitationen in An- und Abwesenheit einer Phosphatase oder, wenn die Kinase bekannt ist, Immunpräzipitationen mit und ohne *Knockdown* der Kinase. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die PI3K-abhängige Phosphorylierung von Fbw7 nicht notwendig für die subzelluläre Lokalisation und bekannte Interaktionen ist und dass die eingeschränkte Funktion der Mutante eine andere, bisher uncharakterisierte

Ursache haben muss. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um herauszufinden, welche molekulare Ursache der eingeschränkten Funktion der Mutante zugrunde liegt.

7.1.7 Die Serin 227-Phosphorylierung hat Einfluss auf die biologische Aktivität von Fbw7

In Experimenten, bei denen in Zellen durch den Entzug von Serum Apoptose ausgelöst wird, konnte festgestellt werden, dass Zellen mit der S227A-Mutante eine schwächere apoptotische Antwort zeigen als Zellen mit Fbw7-WT (Abb. 10A, 0,05 % FBS). Dies ist konsistent mit einer geringeren biologischen Aktivität der Fbw7-Mutante.

Um den Effekt der Phosphorylierung auf die Aktivität von Substratproteinen zu untersuchen, wurden quantitative RT-PCR-Untersuchungen von transkriptionellen Myc-Zielgenen durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass es Myc-Zielgene gibt, die in gleicher Weise auf die beiden Fbw7-Proteine reagieren. Diese sind also bei Myc-aktivierten Genen in gleichem Ausmaß herunterreguliert und bei Myc-reprimierten Genen im gleichem Ausmaß hochreguliert im Vergleich zu Zellen ohne Fbw7. Gleichzeitig wurden aber auch Gene gefunden, die eine schwächere Reaktion auf das mutierte Fbw7 zeigten (Abb. 10C). Daraus kann geschlossen werden, dass die schwächere Fbw7-Aktivität und die resultierende höhere Myc-Proteinmenge in Zellen mit Fbw7-S227A auf verschiedene Myc-Zielgene einen unterschiedlich starken Effekt hat. Bei manchen Myc-Zielgenen ist offensichtlich eine stärkere Fbw7-Aktivität notwendig, um die Myc-abhängige Aktivierung oder Repression zu antagonisieren. Um genauen Aufschluss über die Gruppen der Myc-Zielgene, die differentiell auf die verschiedenen Fbw7-Proteine reagieren, zu erhalten, sind globalere Genexpressionsanalysen notwendig. Eine Möglichkeit wäre ein Microarray in Fbw7-defizienten HCT116-Zellen, die mit Fbw7-WT oder -S227A rekonstituiert worden sind, im Vergleich zu den nur mit dem Leervektor infizierten Zellen. So könnten die Unterschiede in den Genexpressionprofilen von transkriptionellen Myc-Zielgenen und auch anderen Fbw7-Substraten umfassend analysiert und gemeinsame Muster gefunden werden, nach denen ein Gen stark oder schwach auf die unterschiedliche Fbw7-Aktivität reagiert.

7.1.8 Die Bedeutung der Serin 227-Phosphorylierung von Fbw7

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Fbw7 an Serin 227 phosphoryliert wird. Dies geschieht durch Signalwege, die der PI3-Kinase nachgeschaltet sind. Die Konsequenzen dieser Phosphorylierung sind eine verstärkte Fähigkeit von Fbw7, Substrate wie Myc und Zyklin E zu ubiquitinieren und ihren Abbau zu fördern. Gleichzeitig stabilisiert die Phosphorylierung Fbw7 selbst. Auch die Fähigkeit, unter Serumentzug Apoptose auszulösen und die transkriptionelle Aktivität von Myc zu hemmen, wird durch die Phosphorylierung verstärkt.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurde von Mo et al. beschrieben, dass Fbw7 an Serin 227 phosphoryliert wird (Mo et al., 2011). Als Kinase identifizierten Mo et al. die Serum- und Glukokortikoid-induzierte Kinase SGK1. SGK1 gehört zur Familie der AGC-Proteinkinasen. Wie der Name andeutet, wird diese Kinase durch Serum und Glukokortikoide aktiviert. Die im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren wirken über den PI3K-Signalweg, der dann über mTORC1- und PDK1-vermittelte Phosphorylierung SGK1 aktiviert (Hong et al., 2008; Kobayashi and Cohen, 1999). Ein Beispiel für ein Glukokortikoid ist Dexamethason, welches zur experimentellen SGK1-Aktivierung eingesetzt wird, aber auch in der Behandlung von Patienten mit einer akuten lymphatischen Leukämie der T-Zellen (T-ALL) Verwendung findet (Kiefer et al., 1995). Mo et al. haben gezeigt, dass die SGK1-abhängige Phosphorylierung von Serin 227 an Fbw7 die Ubiquitinierung und den Abbau der intrazellulären Domäne von Notch1 (Notch1-IC) fördert. Die Aktivierung von SGK1 durch Dexamethason verstärkt die Phosphorylierung von Fbw7 und reduziert die Proteinmenge von Notch1-IC. Es wurde auch der Effekt der Fbw7-S227A-Punktmutante auf die Mengen an Substratproteinen untersucht. In Abwesenheit von überexprimierter SGK1 ist kaum ein Unterschied in der Proteinmenge von Notch1-IC mit Fbw7-Wildtyp oder -S227A zu erkennen. Erst bei der Überexpression von SGK1 kann Fbw7-Wildtyp die Menge an Notch1-IC effizient reduzieren, während die Überexpression von SGK1 in Fbw7-S227A-exprimierenden Zellen keinen Effekt zeigt. In Bezug auf die Regulation des Myc-Proteins wurde festgestellt, dass Fbw7-Wildtyp in Abwesenheit von überexprimierter SGK1 in der Lage ist, die Proteinmenge an Myc effizient zu reduzieren, während die Fbw7-S227A-Mutante dazu nicht im selben Ausmaß fähig ist. Diese Beobachtung ist konsistent mit den

Ergebnissen dieser Arbeit, wo die S227A-Mutante ebenfalls Myc weniger effizient abbauen kann als das Wildtyp-Protein (Abb. 8A). Die Überexpression von SGK1 hat keinen Effekt auf die Fbw7-S227A-Mutante, verhindert jedoch den Fbw7-Wildtyp-vermittelten Myc-Abbau. Die Autoren haben daraus geschlossen, dass die Phosphorylierung von Fbw7 an Serin 227 durch SGK1 die Aktivität von Fbw7 zum Abbau von Notch1-IC verstärkt, während SGK1 den Abbau von Myc eher hemmt.

Als weiterführende Versuche könnten Phosphorylierungsexperimente mit SGK1 als Kinase und Fbw7-WT und -S227A als Substrate durchgeführt werden. Dabei würde es sich anbieten, SGK1 nicht nur in rekombinanter Form zu verwenden, sondern auch Experimente mit überexprimierter und präzipitierter SGK1 durchzuführen. Dadurch hat man die Möglichkeit, die Zellen mit Dexamethason zu behandeln, und kann so testen, ob die Aktivierung von SGK1 die Phosphorylierung von Fbw7 verstärkt. Außerdem ist ein spezifischer SGK1-Inhibitor verfügbar (GSK650394, (Sherk et al., 2008)), der ebenfalls in den Kinaseexperimenten eingesetzt werden kann, was zu einer Abschwächung oder Aufhebung des Phosphorylierungssignals führen sollte. Neben den radioaktiven *in vitro*-Experimenten könnten auch *in vivo*-Versuche durchgeführt werden, um den Einfluss der Aktivierung oder Inhibierung von SGK1 auf das Signal des phospho-Akt-Substrat-Antikörpers zu untersuchen.

Es ist möglich, dass SGK1 für die in dieser Arbeit beobachteten Effekte verantwortlich ist. Ebenso ist denkbar, dass verschiedene andere Kinasen mit derselben Substratspezifität Fbw7 an Serin 227 phosphorylieren können. In jedem Falle wird die Phosphorylierung durch den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg reguliert. Der PI3K-Signalweg gehört zu den am häufigsten aktivierten Signalwegen in humanen Tumoren (zusammengefasst in (Cully et al., 2006)) und wird durch Wachstumsfaktoren aktiviert, die an Rezeptortyrosinkinasen an der Zelloberfläche binden. Aktive PI3K ist in der Lage, bestimmte Plasmamembranlipide zu phosphorylieren (so entsteht aus Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP₂) Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP₃)). PIP₃ dient als Andockstelle für zytoplasmatische Proteine mit einer Pleckstrin-Homologie-Domäne wie die Kinase Akt, die dann durch Phosphorylierungen aktiviert wird. Aktive Akt-Kinase phosphoryliert wiederum eine Reihe von proapoptotischen oder antiproliferativen Zielproteinen, was hemmend auf deren Funktion wirkt, sodass das Resultat des aktivierten

PI3K/Akt-Signalweges Überleben, Proliferation und Wachstum der Zellen ist. PI3K kann auch direkt von Ras gebunden und aktiviert werden.

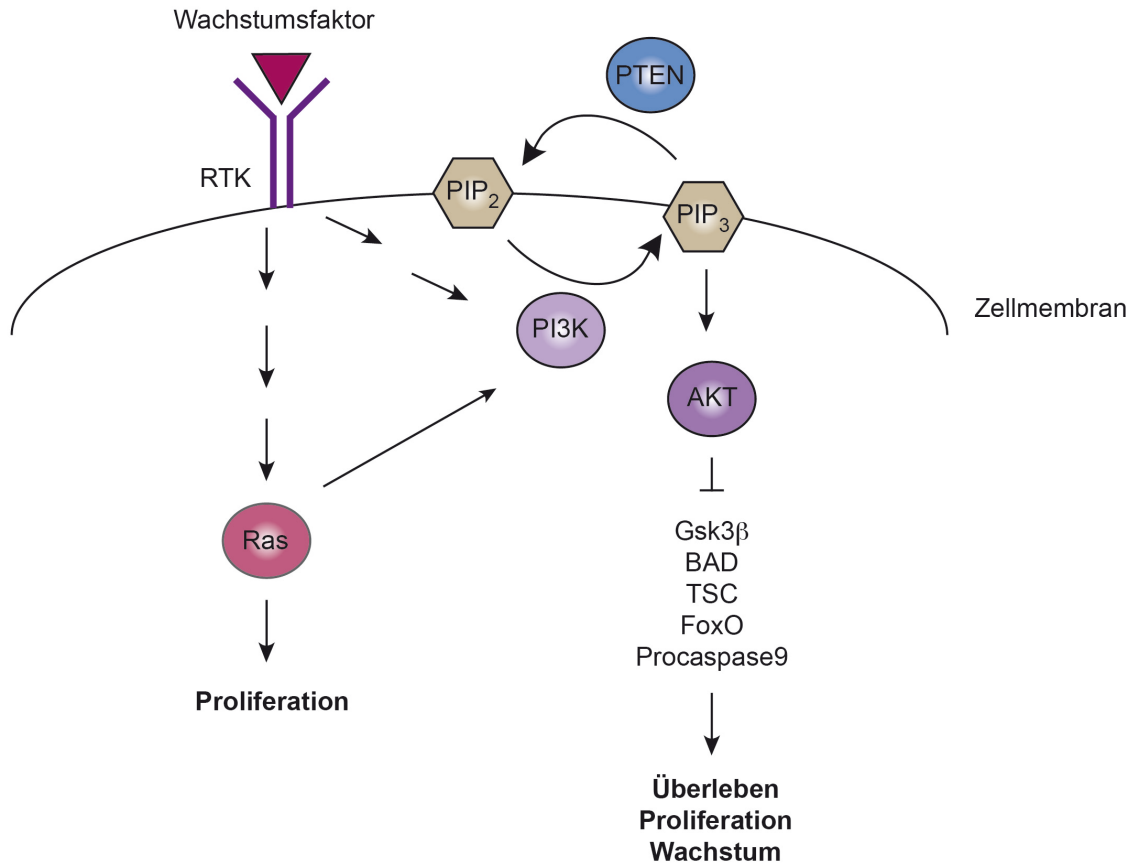


Abb. 25: Schematische Darstellung des PI3K/Akt-Signalweges

Rezeptortyrosinkinasen (RTK) die durch die Bindung von Wachstumsfaktoren aktiviert wurden, lösen intrazelluläre Signalkaskaden aus, die zur Aktivierung von Ras und PI3K führen. Durch die Phosphorylierung von Membranlipiden fördert PI3K die Aktivierung von Akt, welches über inhibitorische Phosphorylierungen von verschiedenen Zielproteinen zu Überleben, Proliferation und Wachstum der Zelle beiträgt. Die Aktivierung von PI3K kann ebenfalls durch direkte Interaktion mit Ras erfolgen (angelehnt an (Cully et al., 2006)).

Warum sollte PI3K, eine Kinase, die das Wachstum und Überleben von Zellen fördert, die Aktivität eines Tumorsuppressorproteins wie Fbw7 stimulieren? Es wäre möglich, dass die Phosphorylierung von Serin 227 die Menge und Aktivität von verschiedenen Fbw7-Substraten so einstellt, dass das Gesamtergebnis zum PI3K-vermittelten Wachstum und Überleben beiträgt. Einige Fbw7-Substrate wie Myc und Jun sind in der Lage, Apoptose auszulösen (Bossy-Wetzel et al., 1997; Prendergast, 1999). Die spezifische

Herunterregulation dieser Proteine könnte Apoptose verhindern und so das Überleben der Zellen ermöglichen. Es wurde bereits ein Beispiel gefunden, wie der PI3K-Signalweg die Myc-induzierte Apoptose abwenden kann: Im E μ -Myc-Lymphommodell konnte gezeigt werden, dass der PI3K-Signalweg über die translationale Aktivierung des antiapoptotischen Proteins Mcl1 die Myc-induzierte Apoptose verhindern, und so die Myc-induzierte Tumorentstehung beschleunigen kann (Mills et al., 2008). Des Weiteren wurde bereits beobachtet, dass die Menge an Myc-Protein der Faktor ist, der über das Resultat der onkogenen Aktivierung von Myc entscheidet. Während niedrigere Mengen an dereguliertem Myc Proliferation auslösen, führen große Mengen an Myc-Protein zur Apoptose (Murphy et al., 2008). Somit könnte die PI3K-induzierte Steigerung der Fbw7-Aktivität zu einer Reduktion der Myc-Level führen, was Proliferation ermöglicht, ohne dass Apoptose ausgelöst wird. Außerdem ist bekannt, dass die Phosphorylierung von T58 in Myc nicht nur Voraussetzung für die Bindung durch Fbw7, sondern auch für die Myc-induzierte Apoptose ist (Hemann et al., 2005). Somit verhindert PI3K die Myc-induzierte Apoptose auf zwei Wegen: Zum einen durch die Hemmung von GSK3 β , die die Phosphorylierung von Myc an T58 verhindert, sodass keine proapoptotische Form von Myc entsteht. Zum anderen durch die Phosphorylierung und Aktivierung von Fbw7, welches dann bestehendes T58-phosphoryliertes Myc effizienter abbauen kann (Abb. 8C).

Die unphosphorylierbare Punktmutante von Fbw7 ist in ihrer Funktion schwächer als das Wildtyp-Protein, ist aber noch zu einem gewissen Grad funktional (Abb. 8). Daher ist es möglich, dass die Aktivierung von Fbw7 durch die PI3K-vermittelte Phosphorylierung nur nötig ist, um bestimmte Funktionen der Substratproteine zu hemmen. Die qRT-PCR-Analyse zeigte, dass die Phosphorylierung von Fbw7 nur für die Herunterregulation einer Gruppe von Myc-Zielgenen erforderlich ist (Abb. 10C), dass also unterschiedliche Myc-Mengen notwendig sind, um verschiedene Zielgene zu transaktivieren oder zu reprimieren. Somit ist die Regulation von Fbw7 durch PI3K notwendig, um selektiv den Abbau bestimmter Substrate zu verstärken und darüber die Aktivität der Substrate zu regulieren.

Eine mögliche Erklärung, warum die PI3K-vermittelte Fbw7-Phosphorylierung nur eine Untergruppe an Myc-Zielgenen beeinflusst, wäre die gezielte Eliminierung von bestimmten funktionellen *Pools* von Myc-Protein. Ein funktioneller *Pool* kann durch bestimmte Phosphorylierungen gekennzeichnet sein. Generell ermöglicht der phosphorylierungsabhängige Abbau, die Menge an Proteinen schnell an die durch

bestimmte Signale vermittelten zellulären Erfordernisse anzupassen. Wenn die Phosphorylierung eines Proteins aber auch funktionelle Interaktionen mit anderen Molekülen als Ubiquitin-Ligasen vermittelt, dann reguliert der phosphorylierungsabhängige Abbau nicht nur die Menge an Protein, sondern auch die Funktion. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Myc an Serin 62 notwendig für die Induktion von Genen ist, die die zelluläre Antwort auf oxidativen Stress vermitteln (Benassi et al., 2006). Darüberhinaus wurde auch gezeigt, dass die Phosphorylierung an Threonin 58 neben der Fbw7-vermittelten Degradierung auch für die Myc-induzierte Apoptose notwendig ist (Hemann et al., 2005). Wenn die PI3K-vermittelte Fbw7-Phosphorylierung also dafür sorgt, dass selektiv ein solcher funktioneller *Pool* von Myc-Protein abgebaut wird, dann können so spezifische Funktionen von Myc beeinflusst werden. Somit könnte ein Mechanismus gefunden worden sein, über den der Ubiquitin-abhängige Proteinabbau die Aktivität eines Substratproteins nicht nur quantitativ sondern auch qualitativ beeinflusst.

Um umfassendere Erkenntnisse über die biologische Funktion und Relevanz des in dieser Arbeit charakterisierten Signalwegs zu erlangen, bietet es sich an, humane Tumore nach Mutationen in den beteiligten Proteinen zu untersuchen.

Aktivierende Mutationen des PI3K-Signalweges werden sehr häufig in humanen Tumoren gefunden. Dabei können alle Ebenen des Signalweges betroffen sein: Es wurden aktivierende Mutationen von PI3K, die Überexpression von Akt oder Wachstumsfaktorrezeptoren und die Inaktivierung von PTEN beobachtet. Auch Fbw7 liegt in ungefähr 6 % der humanen Tumore mutiert vor; dabei kann die chromosomale Region des Fbw7-Gens deletiert sein oder es liegen Punktmutationen vor, die die Substratbindung stören oder zum vorzeitigen Kettenabbruch bei der Translation und somit zu einem verkürzten Protein führen. All diese Mutationen können die Funktion von Fbw7 stören bzw. komplett ausschalten. Bisher gibt es noch keine Berichte über die spezifische Mutation von Serin 227 in humanen Tumoren. Es wäre interessant zu wissen, ob Mutationen dieser Stelle vorliegen und ob sie einen selektiven Vorteil vermitteln, da onkogene Substratproteine dann stabiler sind. Ebenso wäre es interessant zu wissen, wie sich der Phosphorylierungsstatus von nicht-mutiertem Serin 227 in humanen Tumoren darstellt. Dazu würde man Fbw7 aus Tumorproben durch eine Immunpräzipitation isolieren und im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen das

phosphorylierte Peptid um Serin 227 (oder alternativ dem phospho-Akt-Substrat-Antikörper) analysieren. Der Vergleich mit normalen Gewebeproben könnte zeigen, ob eine Hypophosphorylierung von Serin 227 gefunden wird, was zu einer geringeren Aktivität von Fbw7 und somit zu einer Anreicherung seiner onkogenen Substrate führt oder ob vielmehr in Tumoren eine Hyperphosphorylierung dieser Stelle vorliegt, die die Aktivität von Fbw7 steigert und so die Menge an proapoptischen Substraten senkt und zum Überleben der Tumorzellen beiträgt.

Es könnte auch aufschlussreich sein zu untersuchen, ob es eine Korrelation zwischen der Mutation bzw. dem Phosphorylierungsstatus von Serin 227 und dem Vorhandensein von stabilisierenden Mutationen in Myc oder anderen onkogenen Fbw7-Substratproteinen gibt.

Außerdem könnte ein *Knock-In*-Mausmodell, bei dem die S227A-Mutation in den endogenen Fbw7-Lokus eingebracht wird, die Relevanz der Phosphorylierung in verschiedenen Kontexten aufzeigen, z. B. für die Initiation und Aufrechterhaltung von Tumoren in verschiedenen Tumormodellen.

7.2 Charakterisierung eines konditionalen *Usp28-Knockout*-Mausmodells

7.2.1 Die Bedeutung von *Myc* in humanen Tumoren

Das Proto-Onkoprotein *Myc* ist an der Regulation vieler zellulärer Prozesse beteiligt, die die Tumorentstehung fördern können. Wie bereits in Abschnitt 3.4 beschrieben, aktiviert *Myc* Proliferation, Zellwachstum, Metabolismus und Translation und reprimiert Differenzierung und Adhäsion. Das macht *Myc* zu einem sehr wichtigen Protein für die normale Zellfunktion, dessen Deregulation fatale Konsequenzen hat. Etwa 70 % aller humanen Tumore weist eine deregulierte Expression von *Myc* auf. Dies korreliert oft mit einer aggressiven Erkrankung mit schlecht differenzierter Histologie und einer negativen Prognose für die Patienten (Nilsson and Cleveland, 2003). Dabei können Tumore in verschiedenen Geweben auftreten, wie zum Beispiel Kolon-, Brust-, Zervix- und kleinzellige Bronchialkarzinome, Melanome und hämatologische Tumore. Die onkogene Aktivierung von *Myc* kann verschiedene molekulare Ursachen haben, z. B. chromosomale Translokationen, Gen-Amplifikationen, Punktmutationen oder Veränderungen in *Myc*-regulierenden Signalwegen, die zu einer Überexpression, einer verstärkten Translation oder einer erhöhten Proteinstabilität führen.

In hämatologischen Tumoren werden häufig chromosomale Translokationen des *MYC*-Gens gefunden, die die kodierende Sequenz von *MYC* unter die Kontrolle eines aktiven Promotors oder *Enhancers* bringen. Somit sind endogene Transkriptionskontrolle und Autosuppressionsmechanismen nicht mehr möglich und *MYC* wird überexprimiert. Die in 80 % der humanen Burkitt-Lymphome auftretende Translokation zwischen Chromosom 8 und 14 bringt das *MYC*-Gen unter Kontrolle des *Enhancers* der schweren Immunglobulinkette ($E\mu$) und verursacht eine B-Zell-spezifische, konstitutive Überexpression und die Ausbildung eines B-Zell-Lymphoms (Adams et al., 1983). Wie schon in Abschnitt 3.5.4 beschrieben, werden in Burkitt-Lymphomen oftmals auch sekundäre Mutationen in der *Myc*-Sequenz gefunden, die die Stabilität (Salghetti et al., 1999) und das Transformationspotential (Hemann et al., 2005) erhöhen und den Tumorzellen dadurch einen selektiven Vorteil bringen.

In soliden Tumoren hingegen werden vermehrt Amplifikationen des *MYC*-Gens gefunden. Besonders gut beschrieben sind Genamplifikationen für N-*Myc* in Neuroblastomen

(Brodeur et al., 1984; Schwab et al., 1984) und L-Myc in kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Nau et al., 1985); die Amplifikation korreliert dabei mit einer schlechten Prognose für die Patienten. Ein Beispiel für einen Signalweg, der in aktivierter Form zu einer erhöhten *MYC*-Expression führt, ist der Wnt-Signalweg. Liegt das APC-Tumorsuppressorgen in mutierter Form vor, so kommt es zur Akkumulation von β -Catenin, welches dann über die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Tcf-4 zu einer erhöhten Expression von *MYC* führt (He et al., 1998).

7.2.2 Mausmodelle validieren die therapeutische Relevanz der Inhibierung von Myc

Durch verschiedene Mausmodelle konnte ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen Myc-Überexpression und Tumorentstehung nachgewiesen werden, z. B. bei dem in dieser Arbeit verwendeten Modell für B-Zell-Lymphome (Adams et al., 1985) oder bei Modellen für Karzinome der Brust (Schoenenberger et al., 1988).

Interessanterweise ist Myc jedoch nicht nur wichtig für die Entstehung von Tumoren, sondern auch für deren Aufrechterhaltung. In einem Mausmodell, in dem ein Tetrazyklin-regulierbares Myc-Konstrukt gewebespezifisch exprimiert wird, konnte gezeigt werden, dass die anhaltende Expression des exogenen Myc-Allels zur Entstehung von Tumoren führte, die anschließende Inaktivierung des Allels hatte jedoch die Regression dieser etablierten Tumore zur Folge, was mit proliferativem Arrest, Differenzierung und Apoptose der Tumorzellen einherging (Felsher and Bishop, 1999).

In Mausmodellen für das multiple Myelom konnte ein niedermolekularer Inhibitor von BET (*bromodomain and extra-terminal*)-Proteinen selektiv die Expression von Myc und von Myc-Zielgenen reprimieren. BET-Proteine binden an acetylierte Histone, die spezifisch an aktivem Chromatin zu finden sind und wirken offensichtlich als transkriptionelle Koaktivatoren von Myc. Es konnte gezeigt werden, dass die *Enhancer* der schweren Immunglobulinkette, in deren Nähe Myc in multiplen Myelomen häufig transloziert ist, besonders stark von BET-Proteinen gebunden waren. Die Behandlung der Mäuse mit dem BET-Inhibitor verhinderte die Assoziation der BET-Proteine mit den *IgH-Enhancern* und führte zu verringerter Tumorgröße und längerem Überleben der Tiere. Dies stellt ein Beispiel dar, wie über die Inhibition von Koaktivatoren von Myc spezifisch

Einfluss auf die Myc-abhängige Transkription und die Aufrechterhaltung Myc-abhängiger Tumore genommen werden kann (Delmore et al., 2011).

In einem anderen Mausmodell wurde eine dominant-negative Form von Myc (Omomyc) verwendet. Bei Omomyc handelt es sich um eine mutierte Form der BR-HLH/LZ-Domäne von Myc, die mit Myc dimerisieren kann und so kompetitiv die Bindung von Myc an seinen eigentlichen Dimerisierungspartner, Max, verhindert. Im Gegensatz zu Myc-Max-Dimeren können Myc-Omomyc-Dimere jedoch nicht an E-Box-Elemente der DNA binden, sodass die Myc-abhängige transkriptionelle Aktivierung blockiert wird, während die Repression weiter stattfinden kann. In einem Mausmodell, bei dem onkogenes Kras zur Ausbildung von Lungenkarzinomen führt, konnte durch die Expression von Omomyc eine Regression der etablierten Tumore festgestellt werden (Soucek et al., 2008). Allerdings führt die systemische Myc-Inhibierung auch zu einer verringerten Proliferationsrate in normalen regenerativen Geweben wie Haut, Darm und Hoden. Jedoch wurden diese Nebenwirkungen von den Mäusen über einen längeren Zeitraum gut toleriert und waren komplett reversibel. Dadurch zeigt sich, dass nur die Tumorzellen, nicht jedoch normale proliferierende Zellen eine Abhängigkeit von Myc für ihr Überleben aufweisen. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Inhibierung von Myc in Tumoren (sogar in solchen, in denen Myc nicht das auslösende Onkogen war) therapeutisch vielversprechend ist.

Ein Problem bei der Entwicklung von potentiellen Myc-inhibierenden Wirkstoffen stellt jedoch die Tatsache dar, dass es sich bei Myc um einen Transkriptionsfaktor handelt, der im Gegensatz zu Enzymen kein aktives Zentrum besitzt, mit dem ein Wirkstoff interferieren könnte. Myc übt seine Funktionen über Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen aus und diese sind mit niedermolekularen Wirkstoffen schwer zu stören. Daher sind Signalwege, die wichtig für die Stabilität oder Funktion von Myc sind, verstärkt ins Zentrum der Suche nach Angriffspunkten für die indirekte Inhibierung von Myc gerückt.

7.2.3 Usp28 als Protein, das wichtig für die Stabilität von Myc ist

Usp28 wurde in einem retroviralen shRNA-Screen gefunden, bei dem Gene identifiziert werden sollten, die essentiell für die Funktion von Myc sind. Der Screen basierte auf der Fähigkeit von Myc, in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren Apoptose auszulösen. shRNAs, die die Apoptose unter diesen Bedingungen verhindern konnten und das

Wachstum der Zellen erlaubten, waren gegen Gene gerichtet, die notwendig für die Myc-induzierte Apoptose sind. Neben Genen, deren Verbindung zur Myc-induzierten Apoptose schon bekannt war, wurden auch viele Gene gefunden, die bisher nicht mit der Myc-Funktion in Verbindung gebracht wurden. Eines dieser Gene war die Ubiquitin-spezifische Protease Usp28, die daraufhin genauer untersucht wurde (Popov et al., 2007b).

Usp28 kann Myc direkt deubiquitiniere, indem es an die Ubiquitin-Ligase Fbw7 bindet. Dabei bildet Usp28 selektiv mit der nukleären Isoform Fbw7 α und Myc einen ternären Komplex. Die Interaktion eines deubiquitiniierenden Enzyms mit einer Ubiquitin-Ligase wurde schon vorher beschrieben, z. B. bei USP7 und Mdm2 (Li et al., 2004) oder USP33 und VHL (Li et al., 2005). Sie vermittelt vermutlich die Spezifität des deubiquitiniierenden Enzyms gegenüber bestimmten Substraten. Es ist auch denkbar, dass dieser Mechanismus eine schnelle Anpassung der Myc-Proteinmenge in Reaktion auf extrazelluläre Stimuli wie Wachstumsfaktoren oder intrazelluläre Signale wie DNA-Schaden ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass Usp28 für die Stabilität von Myc notwendig ist und dass es einen limitierenden Faktor für die Proliferation von Tumorzelllinien darstellt. Der RNAi-vermittelte Usp28-*Knockdown* führt dazu, dass Myc instabil wird, was auf verstärkten Fbw7-abhängigen Abbau zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu Wildtyp-Myc kommt es bei Verwendung der T58A-Mutante von Myc, die nicht durch Fbw7 abgebaut werden kann, durch den Usp28-*Knockdown* nicht zum Wachstumsarrest, was zeigt, dass Myc das kritische Zielprotein für diesen Phänotyp ist. In humanen Tumoren von Kolon und Brust wurden erhöhte Mengen von Usp28-Protein gefunden. Diese Resultate weisen darauf hin, dass die Inhibierung von Usp28 eine sinnvolle therapeutische Strategie für Myc-abhängige Tumore darstellt. Die Inhibierung von Usp28 durch niedermolekulare Wirkstoffe sollte erreichbar sein, da Usp28 zur Gruppe der Cysteinproteasen gehört, die als Angriffspunkt für Therapeutika geeignet sind. Es wurden bereits zahlreiche Cysteinproteaseinhibitoren entwickelt und in klinischen Studien gegen verschiedene Erkrankungen getestet. Ein Breitspektrum-Caspaseinhibitor (IDN-6556) wird z. B. schon in Phase II-Studien Patienten nach einer Lebertransplantation verabreicht (Leung-Toung et al., 2006). Ein weiteres Beispiel ist der niedermolekulare Wirkstoff WP1130, der die DUB-Aktivität von mehreren, in Tumoren aktivierten DUBs inhibiert und in Tumorzellen einen antiproliferativen und proapoptischen Effekt hat (Kapuria et al., 2010).

7.2.4 Ein konditionales *Knockout*-Mausmodell für Usp28

Es konnte gezeigt werden, dass Usp28 essentiell für die Funktion von Myc und für die Proliferation von Tumorzelllinien ist. Um dieses Konzept genetisch zu validieren, wurde ein konditionales *Knockout*-Mausmodell für Usp28 etabliert.

Das Transgen wurde so generiert, dass eine Cre-Rekombinase die Deletion der Exons 4 und 5 bewirkt. Dies führt zum Funktionsverlust von Usp28, da diese Exons für die katalytische Domäne von Usp28 kodieren (vergleiche auch Abschnitt 6.2.1). Durch Verpaaren der Usp28 fl/fl-Tiere mit Maustämmen, die eine konstitutive (Zp3-Cre) oder konditionale (Rosa26-CreER^{T2}) Cre-Rekombinase exprimieren, wurde der Einfluss der Usp28-Deletion auf die Entwicklung und die Gewebemöostase untersucht. Mit Hilfe des Eμ-Myc-Tumormodells wurde die Bedeutung von Usp28 für die Myc-abhängige Tumorentstehung analysiert.

7.2.5 Effiziente Usp28-Deletion durch verschiedene Cre-Rekombinasen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Usp28-Deletion auf verschiedene Arten erreicht. Zum einen wurden Usp28 fl/fl-MEFs retroviral mit einem Vektor infiziert der für eine konstitutive Cre-Rekombinase kodiert. Zum anderen wurden Usp28 fl/fl-Mäuse mit Rosa26-CreER^{T2}- oder Zp3-Cre-Mäusen verpaart und Organe bzw. MEFs von doppelt transgenen Tieren untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Cre-vermittelte Rekombination von Usp28 in allen diesen Konfigurationen erfolgreich war. Auf DNA-, RNA- und Proteinebene wurde Usp28 effizient deletiert (Abb. 13, 14, 15, 18 und 19). Einzig bei Usp28 fl/fl; Rosa26-CreER^{T2}-Tieren, in denen die Rekombinase durch Tamoxifeninjektionen aktiviert wurde, war keine vollständige Usp28-Deletion festzustellen, sondern nur eine Reduktion der mRNA-Menge um mehr als 50 % (Abb. 14B). Da in den MEFs desselben Genotyps die 4-OHT-Behandlung zu einer vollständigen Deletion führt (Abb. 15B), ist anzunehmen, dass der Grund für die unvollständige Rekombination in den Organen die mangelhafte Verteilung des Tamoxifens im Gewebe ist. Darüberhinaus könnte auch noch untersucht werden, ob mehr Injektionen oder eine längere Wartezeit nach der letzten Injektion zu einer besseren Rekombinationseffizienz führen. Generell ist davon auszugehen, dass die Cre-Rekombinase in einer Zelle immer

vollständig wirkt, also beide Allele rekombiniert, sodass hier kein heterozygoter Genotyp vorliegen sollte.

7.2.6 Auswirkungen einer kompletten Usp28-Deletion auf Mäuse und murine embryonale Fibroblasten

Obwohl die effiziente Usp28-Deletion durch die verschiedenen Methoden zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, waren keine großen biologischen Auswirkungen feststellbar. Die Mäuse mit Zp3-Cre-vermittelter Keimbahndeletion von Usp28 sind lebensfähig, fertil und phänotypisch unauffällig. Weder in den Proteinextrakten aus MEFs noch in denen aus verschiedenen Mausorganen konnte nach einer kompletten Usp28-Deletion ein deutlicher Effekt auf die Myc-Proteinmenge festgestellt werden (Abb. 13C, 14C, 15C, 18C, 19D). Eine generelle Schwierigkeit dabei war, ein qualitativ hochwertiges Western Blot-Signal für murines Myc zu erhalten. Es war notwendig, verschiedene Antikörper und verschiedene Lysemethoden auszutesten. Trotzdem war nicht immer ein zufriedenstellendes Ergebnis möglich. Oft war nur ein sehr schwaches Signal zu detektieren (z. B. in Abb. 13C und 15C). Bei Lysaten aus murinen Organen, in denen auch die Detektion von anderen Proteinen wie Usp28 und Cdk2 oft problematisch war, bestand das Problem, dass der Myc-Antikörper viele Banden detektiert hat und die Zuordnung der korrekten Bande für murines Myc schwierig war (Abb. 14C, 18C). Die prominenten Banden bei 55 bzw. 72 kDa wurden als unspezifisch identifiziert, da sie auch mit einem Zyklin E-Antikörper detektiert wurden und nicht der Laufhöhe des Mycs aus Lymphomproben entsprochen haben. Die erwartete Reduktion der Myc-Proteinmenge nach Usp28-Deletion war nicht feststellbar. Teilweise war eher der umgekehrte Effekt zu beobachten: in Abb. 14C scheinen die Myc-Proteinmengen im Thymus des mit Tamoxifen behandelten CreER^{T2}-Tieres im Vergleich zum Kontrolltier sogar erhöht zu sein.

Um festzustellen, ob die Usp28-Deletion die Stabilität von Myc verändert, wurden Cycloheximid-Experimente mit MEFs durchgeführt. Weder in MEFs mit akuter Usp28-Deletion durch 4-OHT-vermittelte CreER^{T2}-Aktivierung (Abb. 16A), noch in MEFs mit Keimbahndeletion durch Zp3-Cre (Abb. 19E) konnte ein Abbau von Myc, phospho-T58-Myc oder Zyklin E festgestellt werden. Da zur Kontrolle in Abb. 16A auch für Zyklin D1 geblottet wurde und hier ein rascher Abbau nach 20 bis 40 Minuten festgestellt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die Cycloheximid-Behandlung generell

funktioniert hat. Entweder ist diese Art von Experiment für murines Myc so nicht geeignet, oder es liegt wiederum ein Detektionsproblem beim murinen Myc vor.

Kristallviolett-färbungen von MEFs, die durchgeführt wurden, um die Proliferation zu dokumentieren, zeigten, dass die Deletion von Usp28 nicht zum erwarteten Wachstumsarrest der Zellen führt (Popov et al., 2007b); im Gegenteil proliferierten die Cre-infizierten Zellen (Abb. 13D) und die Zp3-Cre-Zellen (Abb. 15D) sogar etwas besser als die Kontrollzellen.

Usp28 spielt auch eine Rolle in der DNA-Schadensantwort. Es wird nach DNA-Schaden durch ATM phosphoryliert, stabilisiert Chk2 und 53BP1 und ist für die durch DNA-Schaden ausgelöste Apoptose notwendig (Matsuoka et al., 2007; Zhang et al., 2006). Deshalb wurden MEFs nach akuter Usp28-Deletion mit UVB-Strahlung behandelt und im Western Blot die Proteine, die bei der DNA-Schadensantwort beteiligt sind, untersucht (Abb. 16B). Es konnte keine Reduktion von 53BP1 nach Usp28-Deletion festgestellt werden. Bei den anderen untersuchten DNA-Schadensproteinen konnte kein Unterschied zwischen Usp28-profizienten und -defizienten Zellen festgestellt werden.

Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, warum entgegengesetzt zu den bereits veröffentlichten Ergebnissen der Usp28-*Knockout* im Mausmodell nicht die erwarteten Effekte hat. Während der shRNA-vermittelte *Knockdown* von Usp28 in Tumorzellen die Proliferation hemmt, proliferieren MEFs mit kompletter Usp28-Deletion sogar etwas besser als Kontroll-MEFs. Und während der shRNA-vermittelte *Knockdown* von Usp28 in Tumorzellen dazu führt, dass Myc instabil wird, zeigen weder MEFs noch Organproben eine Reduktion der Myc-Proteinmengen.

Zum einen könnte der Grund bei den in den shRNA-Experimenten verwendeten Tumorzelllinien liegen. Womöglich weisen diese transformierten Zelllinien - im Vergleich zu embryonalen Fibroblasten - Veränderungen auf, die sie anfälliger für die Deletion von Usp28 machen.

Zum anderen ist es möglich, dass in den Mäusen ein kompensatorischer Mechanismus auftritt, d. h. die Deletion von Usp28 wird durch ein anderes Protein kompensiert. Ein Kandidat dafür wäre Usp25, das deubiquitinierende Enzym, das am nächsten mit Usp28 verwandt ist (Valero et al., 2001). Popov et al. konnten zwar zeigen, dass Usp25 den Fbw7-vermittelten Abbau von Myc in Tumorzelllinien nicht antagonisieren kann, jedoch

ist es sehr wahrscheinlich, dass in einem Organismus andere Kompensationsmechanismen möglich sind als in etablierten Zelllinien. Andererseits konnte auch die akute Usp28-Deletion durch die induzierbare CreER^{T2} nicht die erwarteten Effekte zeigen. Da in dem Fall nur wenige Tage zwischen der Deletion und der Analyse liegen, ist eine Kompensation hier unwahrscheinlich. Außerdem konnte in qRT-PCR-Experimenten keine Hochregulation von Usp25 nach Usp28-Deletion auf RNA-Ebene nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings wäre es auch möglich, dass ein Protein postranslational stabilisiert oder aktiviert wird, um kompensatorisch zu wirken. Um Erkenntnisse über eine mögliche Kompensation durch ein anderes deubiquitinierendes Enzym zu erlangen, könnte ein RNAi-vermittelter *Knockdown* von Usp25 in Usp28-defizienten MEFs durchgeführt werden. Sollte der *Knockdown* dieses Enzyms keinen Effekt haben, so wäre ein *Screen* mit shRNAs gegen verschiedene DUBs denkbar. Die shRNA, die nur in Usp28-deletierten Zellen zur Destabilisierung von Myc führt, ist gegen ein deubiquitinierendes Enzym gerichtet, das die Usp28-Deletion kompensieren kann.

7.2.7 Der heterozygote Usp28-Knockout zeigt in murinen embryonalen Fibroblasten einen Unterschied zur homozygoten Usp28-Deletion

Ein weiterer Unterschied zwischen den ursprünglichen Experimenten von Popov et al. und dem in dieser Arbeit charakterisierten Mausmodell liegt im Ausmaß der Usp28-Reduktion. Während eine shRNA meist nur zu einer Reduktion der mRNA-Menge und folglich der Proteinmenge führt, wurde hier zunächst ein kompletter, homozygoter *Knockout* analysiert. Um nachzuprüfen, ob es eine Dosisabhängigkeit bei der Usp28-Reduktion gibt, ob also die Deletion eines Allels (Reduktion um 50 %) andere Auswirkungen hat als die Deletion beider Allele, wurden mit Hilfe des Zp3-Cre-Mausstamms MEFs der drei möglichen Usp28-Genotypen hergestellt: Usp28 +/+, Usp28 +/- und Usp28 -/-.

Die Reduktion von Usp28-mRNA und -Protein erfolgt dabei linear, das heißt in den Usp28 +/- MEFs ist noch ungefähr 50 % der ursprünglichen Menge an RNA (Abb. 19B) und Protein (Abb. 19D) vorhanden.

Bei der Analyse des Wachstumsverhaltens der Zellen durch Kristallviolett-färbungen (Abb. 20A) und das Erstellen einer Wachstumskurve (Abb. 20B) wurden Unterschiede im Proliferationsverhalten deutlich: Im Vergleich zu den parentalen, Usp28-profizienten Zellen wachsen die Zellen mit kompletter Usp28-Deletion schneller, was schon nach Cre-

Infektion (Abb. 13D) und CreER^{T2}-Aktivierung (Abb. 15D) festgestellt worden war. Überraschend war jedoch, dass die Zellen, in denen nur ein Allel von Usp28 deletiert war, deutlich langsamer wuchsen als die beiden anderen Genotypen. Dieses Resultat wurde mit MEFs von verschiedenen Embryonen und von verschiedenen Würfen verifiziert (Daten nicht gezeigt), um sicherzustellen, dass es sich nicht um einen zufälligen Wachstumsdefekt einer MEF-Präparation handelt. Dieses Ergebnis ist konsistent mit dem beobachteten Proliferationsdefekt nach shRNA-vermittelter Usp28-Reduktion bei Popov et al.

Auch in ihrer Morphologie unterschieden sich die Usp28 +/- MEFs deutlich von den anderen beiden Genotypen, da hier viele flache, stark vergrößerte Zellen mit langen Zellausläufern gefunden wurden (Abb. 20C).

Da diese Morphologie auf einen seneszenten Phänotyp hinweist, wurde eine SA-β-Gal-Färbung durchgeführt (Abb. 20D). Dabei zeigte sich, dass die Usp28 +/- Zellen eine stärkere Blaufärbung aufwiesen als die anderen Zellen. Da sich alle Zellen in der selben Passage befanden, kann daraus geschlossen werden, dass die Zellen mit heterozygoter Usp28-Deletion früher seneszent werden. Damit im Einklang steht die erhöhte Expression von p19^{ARF}, die in diesen Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 19D).

7.2.8 Auch im Eμ-Myc-Lymphommodell zeigt die heterozygote Usp28-Deletion Unterschiede im Vergleich zu den homozygoten Genotypen

Um die Relevanz von Usp28 bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Myc-abhängigen Tumoren zu untersuchen, wurde das Eμ-Myc-Lymphommodell herangezogen. Damit sollte überprüft werden, ob diese Myc-abhängigen Tumore auf die stabilisierende Wirkung von Usp28 angewiesen sind, in welchem Fall ihnen der Usp28-Knockout die Wachstumsgrundlage entziehen würde.

In Abbildung 21 ist die chromosomale Translokation dargestellt, die die kodierende Sequenz von Myc unter die Kontrolle des Enhancers der schweren Immunglobulinkette bringt. Diese Translokation ist typisch für das humane Burkitt-Lymphom, ein malignes Lymphom aus der Gruppe der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome. Während in Europa und Nordamerika vor allem eine spontane Form des Burkitt-Lymphoms auftritt (also mit spontan auftretender Translokation), findet sich in Äquatorialafrika eine endemische Form, d. h. diese Form tritt fortdauernd und gehäuft in dieser begrenzten Region auf. Als Ursache

dafür wird eine Malariainfektion angesehen, die das Immunsystem supprimiert und die Betroffenen anfälliger für eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus macht, die zur Proliferation und Immortalisierung der B-Zellen führt. In manchen Zellen kommt es zu einer Störung des Mechanismus, der das Rearrangement der Immunglobulingene kontrolliert und so kann es zur reziproken Translokation der Antikörpergene und des Myc-Proto-Onkogens kommen, was die Proliferation der B-Zellen weiter fördert und zur Ausbildung eines Burkitt-Lymphoms führt. Da Malaria- und Epstein-Barr-Infektionen vor allem in Äquatorialafrika auftreten, ist auch die endemische Form des Burkitt-Lymphoms auf diesen geographischen Bereich beschränkt (Weinberg, 2007).

Im E μ -Myc-Lymphommodell kommt es zu einer konstitutiven Überexpression von Myc in den B-Lymphozyten, was zur Ausbildung spontaner B-Zell-Lymphome in den Tieren führt.

Durch Kreuzungen wurden Tiere aller drei möglichen Usp28-Genotypen (Usp28 +/+, Usp28 +/- und Usp28 -/-) gezüchtet, die jeweils eine Kopie des E μ -Myc-Transgens trugen.

Western Blot-Untersuchungen von Proteinextrakten aus Tumorproben zeigten, dass entgegen der Erwartungen in den Proben der homozygot-deletierten Tiere erhöhte Mengen an verschiedenen Usp28-Substratproteinen gefunden wurden. Im Gegensatz dazu fanden sich in den Proben der heterozygoten Tiere deutlich reduzierte Mengen an Proteinen wie Myc, 53BP1, Fbw7 γ , SREBP1 und Zyklin E. Fbw7 α ist in diesen Proben praktisch gar nicht mehr nachweisbar (Abb. 23B und C). Die Ladekontrolle β -Aktin und die Blots für Usp28 und p19^{ARF} deuten darauf hin, dass dies kein systematischer Effekt ist, dass also nicht generell die Gesamtproteinmenge in den Usp28 -/- Tieren höher und in den Usp28 +/- Tieren niedriger ist (Abb. 23B). Jedoch wurden ebenso Tumore gefunden, in denen sich die Proteinmengen von Myc und Zyklin E nicht zwischen den einzelnen Genotypen unterscheiden haben (Abb. 23D). Es scheint also eine gewisse Variabilität zwischen verschiedenen Individuen zu geben. Da auch der zeitliche Verlauf der Erkrankung deutlich variieren kann (sowohl das Alter beim Auftreten der ersten Krankheitszeichen als auch die Geschwindigkeit des Krankheitsverlaufs betreffend) (Harris et al., 1988), wurde überprüft, ob eine Korrelation zwischen dem Alter der Tiere bei der Entnahme der Tumore und der Proteinmengen besteht. Ein solcher Zusammenhang konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings wurde in den Tumoren nicht das Ausmaß von Apoptose und Seneszenz verglichen. Da hohe Myc-

Mengen Apoptose auslösen können, müssen hohe Myc-Level nicht zwingend zu einem aggressiveren Tumor und einem kürzeren Überleben der Mäuse führen. Immunhistochemische Untersuchungen der Tumore könnten hier aufschlussreich sein.

Um dennoch einen globaleren Eindruck der Myc-Proteinmenge in diesen Tumoren zu bekommen, wurden 12 Tumorproben nebeneinander auf einem Gel verglichen. Dabei zeigte sich, dass es in der Tat eine Variabilität innerhalb desselben Genotyps gibt. Gleichzeitig wurde aber bestätigt, dass es eine Tendenz zu niedrigen Myc-Proteinleveln in Tumoren von Usp28 +/- Tieren gibt (Abb. 23E).

Da die Entstehung der E μ -Myc-Tumore von einer hohen Myc-Expression abhängt, könnten die Usp28 +/- Tiere einen Überlebensvorteil haben. Um dies zu überprüfen, wurde aus der tumorfreien Überlebenszeit der Mäuse eine Überlebenskurve erstellt (Abb. 24). Die Kurve zeigt, dass die Usp28 +/- Tiere mit 19 Wochen die längste mittlere Überlebenszeit aufweisen, was gegenüber den Usp28 ++ Tieren mit 14,5 Wochen signifikant länger ist ($p=0,0244$). Insofern liegt doch eine generelle Korrelation zwischen den Usp28-Genotypen und den Myc-Proteinmengen einerseits und zwischen den Usp28-Genotypen und der mittleren tumorfreien Überlebenszeit andererseits vor. Der Unterschied zwischen den mittleren Überlebenszeiten der Usp28 ++ und Usp28 -/- Tiere ist nicht statistisch signifikant, was ebenso mit den Myc-Proteinmengen dieser Tumore korreliert, die sich nicht sehr stark unterscheiden, vielleicht tendenziell im kompletten *Knockout* etwas höher sind.

7.2.9 Mögliche Ursachen für den stärkeren Effekt der heterozygoten Usp28-Deletion auf Myc-Proteinmengen und Myc-abhängige Tumorentstehung

Die für diese Arbeit durchgeführten Experimente deuten darauf hin, dass die Deletion eines Allels von Usp28 in MEFs zu einem Proliferationsdefekt und frühzeitiger Seneszenz führt. In E μ -Myc-Lymphomen führt die heterozygote Usp28-Deletion zu tendenziell reduzierten Myc-Proteinmengen und verlängert das tumorfreie Überleben dieser Tiere. Die Deletion beider Usp28-Allele hingegen zeigt in keiner Hinsicht die erwarteten Effekte. Im Gegenteil wachsen Usp28 -/- MEFs sogar schneller als Wildtyp-MEFs und E μ -Myc-Lymphome von Usp28 -/- Tieren weisen erhöhte Myc-Proteinmengen auf. Konsistent damit zeigen diese Tiere auch ein etwas kürzeres tumorfreies Überleben als die Usp28 ++ Mäuse. Somit scheint der ursprünglich beobachtete Effekt der shRNA-vermittelten Usp28-

Reduktion in Tumorzellen (Popov et al., 2007b) nur im heterozygoten *Knockout* reproduzierbar zu sein. Das deutet darauf hin, dass das Ausmaß der Usp28-Reduktion ein entscheidender Faktor für die resultierenden Effekte ist.

Eine ähnliche Regulation wurde bereits für das deubiquitinierende Enzym Usp7/HAUSP beschrieben (Kon et al., 2010). HAUSP stabilisiert sowohl das Tumorsuppressorprotein p53 als auch dessen E3-Ligase Mdm2. Daher führt eine moderate HAUSP-Reduktion durch RNAi in Tumorzellen zur Destabilisierung von p53. Eine komplette HAUSP-Deletion hingegen stabilisiert p53 durch die Destabilisierung seiner E3-Ligase Mdm2. Dies erinnert an die in dieser Arbeit beobachteten Effekte einer Usp28-Deletion. Der Unterschied ist allerdings, dass hier in den Usp28 +/- Proben sowohl die Level an Substratproteinen wie Myc, als auch an Fbw7 α stark reduziert sind, wohingegen in den Usp28 -/- Proben sowohl die Level an Myc, als auch an Fbw7 α im Vergleich zum Wildtyp erhöht sind. Wenn also Fbw7 α ebenfalls ein Substrat für die Usp28-abhängige Stabilisierung ist, so reagiert es wie die anderen Substrate und wird nach Deletion eines Usp28-Allels instabil, akkumuliert aber nach Deletion beider Usp28-Allele (siehe auch Abb. 26). Ein weiterer Unterschied ist, dass der vollständige *Knockout* von HAUSP im Gegensatz zu Usp28 embryonal letal ist, was wiederum auf eine Kompensation durch ein anderes deubiquitinierendes Enzym im Fall einer Usp28-Deletion hindeutet (vergleiche Abschnitt 7.2.6). Untersuchungen in Hefe haben gezeigt, dass viele DUBs redundante Funktionen haben können (Amerik et al., 2000). Es ist denkbar, dass einige DUBs essentielle, nicht redundante Funktionen ausüben und ihr kompletter *Knockout* daher zur embryonalen Letalität führt wie bei HAUSP/Usp7 oder Usp8 (Niendorf et al., 2007), während die Deletion anderer DUBs wie Usp28 kompensiert werden kann und daher weder zur embryonalen Letalität noch zu einem offensichtlichen Phänotyp führt.

Um zu validieren, ob tatsächlich eine Dosisabhängigkeit bei der Deletion von Usp28 vorliegt, ob also generell eine Reduktion der Usp28-Menge einen stärkeren Effekt auf Zielproteine und Proliferation hat als eine komplette Deletion, könnte eine Tetrazyklin-induzierbare shRNA gegen Usp28 verwendet werden. Mit einem solchen System kann die Expression einer shRNA durch Zugabe von Tetrazyklin oder dessen Derivat Doxyzyklin zum Zellkulturmedium induziert werden (Gossen and Bujard, 1992). Durch Titration der Menge an zugegebenem Tetrazyklin oder Doxyzyklin kann die Expression der shRNA und somit die Stärke des *Knockdowns* genau eingestellt werden. Somit könnten mit einem

einzelnen System die Effekte einer Usp28-Reduktion in verschiedenem Ausmaß verglichen werden.

Außerdem wäre es wichtig zu untersuchen, ob die akute Herbeiführung des heterozygoten Zustands in Mäusen oder MEFs zu stärkeren Effekten führt, da hier eventuell keine Kompensation möglich ist. Dazu müssten Usp28 fl/wt; CreER^{T2}-Mäuse mit Tamoxifen behandelt werden, um das eine gefloخته Allel akut zu deletieren. Dann könnten die Mäuse für Veränderungen beobachtet, bzw. Organproben entnommen werden, um die Myc-Proteinmengen zu bestimmen. Ebenso könnten Usp28 fl/wt; CreER^{T2}-MEFs isoliert werden und durch Zugabe von 4-OHT zum Kulturmedium das eine gefloخته Allel akut deletiert werden.

Eine weitere mögliche Erklärung für den stärkeren Effekt der heterozygoten Usp28-Deletion könnte sein, dass das rekombinierte Allel zusammen mit dem Wildtyp-Allel im heterozygoten Zustand dominant-negativ wirkt. Dazu müsste vom rekombinierten Allel ein verkürztes Protein entstehen, welches z. B. immer noch Substratproteine binden kann, jedoch nicht mehr in der Lage ist, sie zu deubiquitinieren. Gegen diese Theorie spricht, dass bei der Analyse der MEFs im Western Blot kein verkürztes Protein mit dem Usp28-Antikörper nachweisbar war (Abb. 19C).

Generell sind für die Effekte der Usp28-Deletion verschiedene Szenarien denkbar. Normalerweise liegt im Zellkern ein ternärer Komplex aus Fbw7 α , Myc und Usp28 vor. Dabei fördert Fbw7 α den Abbau von Myc, während Usp28 Myc stabilisieren kann. Gleichzeitig kann Usp28 aber auch Fbw7 α stabilisieren (Nikita Popov, persönliche Mitteilung). Kommt es nun zur Deletion von Usp28, wäre die Erwartung, dass Fbw7 α in der Lage ist, Myc effizient abzubauen. Es ist bekannt, dass F-Box-Proteine ihren eigenen Abbau fördern, wenn ihre Substrate nicht mehr vorhanden sind. Daher wäre es möglich, dass Fbw7 α in den Usp28 +/- Tumoren nach effizientem Substratabbau zum autokatalytischen Abbau übergeht, was die niedrigen Level an Myc und Fbw7 α in diesen Proben erklären würde. Andererseits ist es auch denkbar, dass Fbw7 α selbst in Abwesenheit von Usp28 so instabil wird, dass Substrate wie Myc nicht mehr abgebaut werden können und akkumulieren (wie es bei HAUSP/p53/Mdm2 der Fall ist). Dieses Szenario scheint im untersuchten Modell allerdings nicht vorzuliegen, da in den Usp28 +/- Proben sowohl die Fbw7 α -, als auch die Myc-Proteinmengen reduziert sind.

Darüberhinaus könnte auch in den Usp28 +/- Tumoren, in denen kein Fbw7 mehr nachweisbar ist, Fbw7 γ den Abbau von Myc im Nukleolus übernehmen (Abb. 26).

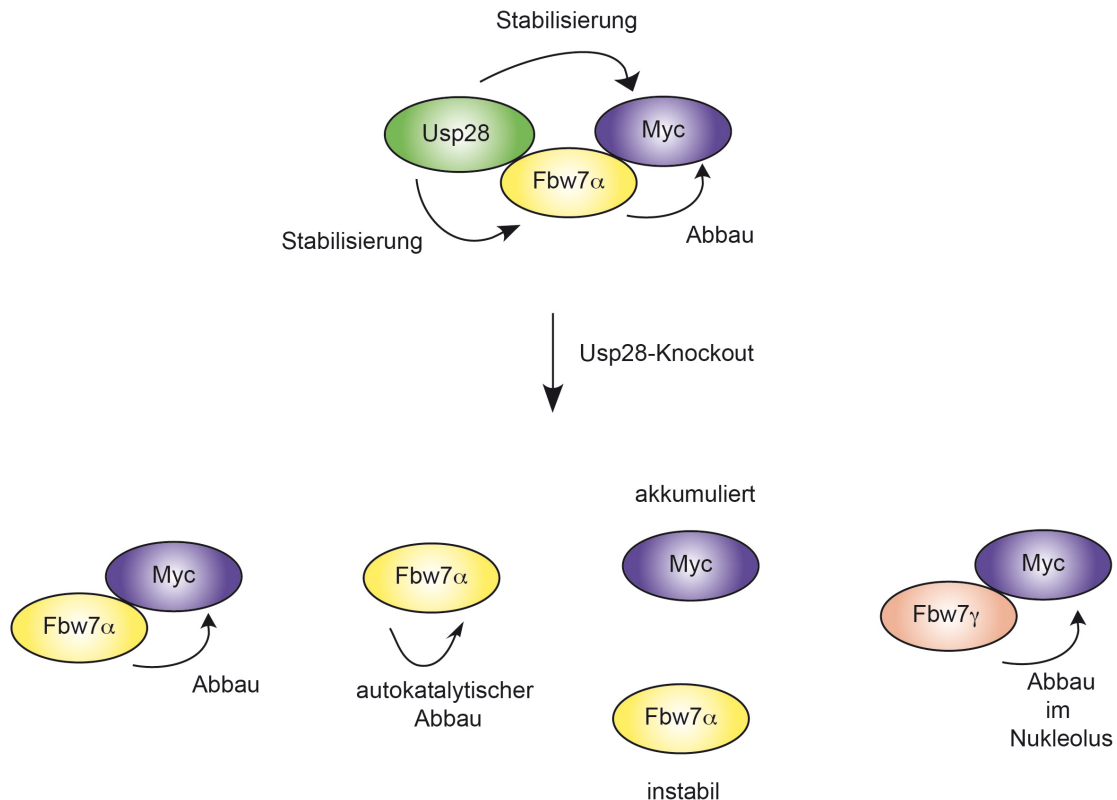


Abb. 26: Schematische Darstellung der verschiedenen möglichen Effekte der Usp28-Deletion

In der normalen Situation existiert ein ternärer Komplex aus Fbw7 α , Usp28 und Myc im Zellkern. Dabei führt Fbw7 α zum Abbau von Myc, während Usp28 Myc stabilisieren kann. Gleichzeitig kann Usp28 aber auch stabilisierend auf Fbw7 α wirken. Durch den Usp28-Knockout sind verschiedene alternative Szenarien denkbar (von links nach rechts): Ohne Usp28 ist Fbw7 α in der Lage, Myc effektiv abzubauen; Fbw7 α kann sich effizient autokatalytisch abbauen; ohne Usp28 wird Fbw7 α selbst instabil, sodass Myc akkumuliert; Fbw7 γ kann im Nukleolus den Abbau von Myc übernehmen.

All diese Szenarien können allerdings nicht erklären, warum Fbw7 α bei homozygoter Usp28-Deletion nicht in der Lage ist, Substrate wie Myc abzubauen. Abgesehen von der bereits diskutierten Möglichkeit einer Kompensation ist es auch möglich, dass Usp28 neben seiner katalytischen, deubiquitinierenden Funktion noch eine nicht-katalytische Funktion ausübt. So könnte Usp28 als Gerüst für Fbw7 α und seine Substrate dienen, sodass Fbw7 α im vollständigen Usp28-Knockout nicht mehr in Kontakt mit seinen Substraten kommen kann, was zu deren Akkumulation führt. Im heterozygoten Zustand hingegen ist noch genügend Usp28-Protein vorhanden, um die nicht-katalytische Funktion auszuüben, sodass Substrate weiterhin von Fbw7 abgebaut werden können. Die Usp28-

Proteinmenge reicht jedoch nicht mehr aus, um die katalytische, stabilisierende Funktion auszuüben, sodass es zu einer Destabilisierung und Reduktion der Substratproteine kommt. Um diese Theorie zu überprüfen, könnte man mit der katalytisch-inaktiven Mutante von Usp28 arbeiten, in der das katalytische Cystein 171 zu Alanin mutiert ist. Durch die retrovirale Infektion dieser Mutante z. B. in Lymphomzellen mit kompletter Usp28-Deletion sollte ausschließlich die nicht-katalytische Funktion von Usp28 wieder hergestellt werden und der Fbw7-vermittelte Substratabbau wieder möglich sein, was sich in einer Reduktion der Proteinlevel zeigen sollte. Durch Immunfluoreszenz-Untersuchungen kann die subzelluläre Lokalisation der verschiedenen Fbw7-Isoformen überprüft werden, um festzustellen, ob unter den verschiedenen Usp28-*Knockout*-Situationen Fbw7 und seine Substrate zusammen im Nukleus lokalisiert sind.

Koimmunpräzipitations-Experimente von Fbw7 und seinen Substraten aus Lymphomproben können Aufschluss darüber geben, ob diese Interaktionen in Abwesenheit von Usp28 weiter stattfinden können.

Möglicherweise ist das E μ -Myc-Lymphommodell nicht das optimale System, um den Einfluss einer Usp28-Deletion auf die Tumorgenese zu untersuchen. Da sich die Lymphome relativ schnell entwickeln und sehr heterogen sind, ist der Einfluss der stabilisierenden Wirkung von Usp28 auf Myc eventuell nicht so bedeutend. Außerdem ist das E μ -Myc-Transgen im Vergleich zu endogenem Myc ungefähr fünfmal stärker exprimiert, was die Stöchiometrie zwischen Myc und Usp28 aus dem Gleichgewicht bringen könnte. Ein weiteres Tumormodell, um Usp28 als essentielles Enzym für die Myc-Funktion zu validieren, ist das durch mutiertes Kras induzierte Adenokarzinom der Lunge. Diese Mäuse exprimieren ein LSL-Kras^{G12D}-Transgen. Durch die Lox-Stop-Lox-(LSL)-Kassette ist das Transgen inaktiv, bis eine Cre-Rekombinase durch Rekombination der beiden LoxP-Sequenzen die Stop-Sequenz entfernt. Die Cre-Rekombinase wird durch Inhalation von Cre-exprimierenden Adenoviren verabreicht, wodurch die Expression von Kras^{G12D} auf die Lunge begrenzt ist. Das Kras ist durch die G12D-Punktmutation, die auch in humanen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen gefunden wird, onkogen aktiviert und führt zur Ausbildung von Adenomen, die sich weiter in Adenokarzinome entwickeln können (Jackson et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass endogenes Myc für die Entstehung und Aufrechterhaltung dieser Tumore notwendig ist. Die Inhibition von Myc konnte in diesem Tumormodell die Entstehung der Lungentumore verhindern. Etablierte

Tumore zeigten nach Myc-Inhibierung eine Regression, die von reduzierter Proliferation und vermehrter Apoptose im Tumorgewebe begleitet wurde (Soucek et al., 2008). Ein Vorteil dieses Modells ist, dass Myc in endogener Form vorliegt und nicht wie im E μ -Myc-Lymphommodell transloziert und stark überexprimiert ist. Endogenes Myc könnte eine höhere Abhängigkeit von der Stabilisierung durch Usp28 zeigen, und somit die Usp28-Deletion stärkere Auswirkungen auf Myc-Stabilität und die Tumorentstehung haben.

8 Literaturverzeichnis

Adams, J. M., Gerondakis, S., Webb, E., Corcoran, L. M., and Cory, S. (1983). Cellular myc oncogene is altered by chromosome translocation to an immunoglobulin locus in murine plasmacytomas and is rearranged similarly in human Burkitt lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* *80*, 1982-1986.

Adams, J. M., Harris, A. W., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D., and Brinster, R. L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* *318*, 533-538.

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.

Akhoondi, S., Sun, D., von der Lehr, N., Apostolidou, S., Klotz, K., Maljukova, A., Cepeda, D., Fiegl, H., Dafou, D., Marth, C., *et al.* (2007). FBXW7/hCDC4 is a general tumor suppressor in human cancer. *Cancer Res* *67*, 9006-9012.

Amerik, A. Y., and Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* *1695*, 189-207.

Amerik, A. Y., Li, S. J., and Hochstrasser, M. (2000). Analysis of the deubiquitinating enzymes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem* *381*, 981-992.

Arnold, H. K., Zhang, X., Daniel, C. J., Tibbitts, D., Escamilla-Powers, J., Farrell, A., Tokarz, S., Morgan, C., and Sears, R. C. (2009). The Axin1 scaffold protein promotes formation of a degradation complex for c-Myc. *Embo J* *28*, 500-512.

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.

Bakkenist, C. J., and Kastan, M. B. (2004). Initiating cellular stress responses. *Cell* *118*, 9-17.

Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L. V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V. C., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* *444*, 633-637.

Benassi, B., Fanciulli, M., Fiorentino, F., Porrello, A., Chiorino, G., Loda, M., Zupi, G., and Biroccio, A. (2006). c-Myc phosphorylation is required for cellular response to oxidative stress. *Mol Cell* *21*, 509-519.

- Bentley, D. L., and Groudine, M. (1986). A block to elongation is largely responsible for decreased transcription of c-myc in differentiated HL60 cells. *Nature* 321, 702-706.
- Bentley, D. L., and Groudine, M. (1988). Sequence requirements for premature termination of transcription in the human c-myc gene. *Cell* 53, 245-256.
- Bernards, R., Brummelkamp, T. R., and Beijersbergen, R. L. (2006). shRNA libraries and their use in cancer genetics. *Nat Methods* 3, 701-706.
- Bernstein, P. L., Herrick, D. J., Prokipcak, R. D., and Ross, J. (1992). Control of c-myc mRNA half-life in vitro by a protein capable of binding to a coding region stability determinant. *Genes Dev* 6, 642-654.
- 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.
- Blackwood, E. M., and Eisenman, R. N. (1991). Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* 251, 1211-1217.
- Bonetti, P., Davoli, T., Sironi, C., Amati, B., Pelicci, P. G., and Colombo, E. (2008). Nucleophosmin and its AML-associated mutant regulate c-Myc turnover through Fbw7 gamma. *J Cell Biol* 182, 19-26.
- Bossy-Wetzel, E., Bakiri, L., and Yaniv, M. (1997). Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *Embo J* 16, 1695-1709.
- 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.
- 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.
- Brewer, G., and Ross, J. (1988). Poly(A) shortening and degradation of the 3' A+U-rich sequences of human c-myc mRNA in a cell-free system. *Mol Cell Biol* 8, 1697-1708.
- 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.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Cannell, I. G., Kong, Y. W., Johnston, S. J., Chen, M. L., Collins, H. M., Dobbyn, H. C., Elia, A., Kress, T. R., Dickens, M., Clemens, M. J., *et al.* (2010). p38 MAPK/MK2-mediated induction of miR-34c following DNA damage prevents Myc-dependent DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5375-5380.

- Cardozo, T., and Pagano, M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 739-751.
- Carter, P. S., Jarquin-Pardo, M., and De Benedetti, A. (1999). Differential expression of Myc1 and Myc2 isoforms in cells transformed by eIF4E: evidence for internal ribosome repositioning in the human c-myc 5'UTR. *Oncogene* 18, 4326-4335.
- Choi, S. H., Wright, J. B., Gerber, S. A., and Cole, M. D. (2010). Myc protein is stabilized by suppression of a novel E3 ligase complex in cancer cells. *Genes Dev* 24, 1236-1241.
- Ciechanover, A., and Ben-Saadon, R. (2004). N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol* 14, 103-106.
- 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. (2007). 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.
- Cully, M., You, H., Levine, A. J., and Mak, T. W. (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 6, 184-192.
- Dang, C. V., and Lee, W. M. (1988). Identification of the human c-myc protein nuclear translocation signal. *Mol Cell Biol* 8, 4048-4054.
- 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.
- Delmore, J. E., Issa, G. C., Lemieux, M. E., Rahl, P. B., Shi, J., Jacobs, H. M., Kastiris, E., Gilpatrick, T., Paranal, R. M., Qi, J., *et al.* (2011). BET Bromodomain Inhibition as a Therapeutic Strategy to Target c-Myc. *Cell* 146, 904-917.
- Deshaies, R. J., and Joazeiro, C. A. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78, 399-434.
- Doyle, G. A., Bourdeau-Heller, J. M., Coulthard, S., Meisner, L. F., and Ross, J. (2000). Amplification in human breast cancer of a gene encoding a c-myc mRNA-binding protein. *Cancer Res* 60, 2756-2759.
- Dunnick, W., Shell, B. E., and Dery, C. (1983). DNA sequences near the site of reciprocal recombination between a c-myc oncogene and an immunoglobulin switch region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 7269-7273.
- Durgan, J., and Parker, P. J. (2010). Regulation of the tumour suppressor Fbw7alpha by PKC-dependent phosphorylation and cancer-associated mutations. *Biochem J* 432, 77-87.

- Eick, D., and Bornkamm, G. W. (1986). Transcriptional arrest within the first exon is a fast control mechanism in c-myc gene expression. *Nucleic Acids Res* *14*, 8331-8346.
- Felsher, D. W., and Bishop, J. M. (1999). Reversible tumorigenesis by MYC in hematopoietic lineages. *Mol Cell* *4*, 199-207.
- Fernandez-Pol, J. A., Talkad, V. D., Klos, D. J., and Hamilton, P. D. (1987). Suppression of the EGF-dependent induction of c-myc proto-oncogene expression by transforming growth factor beta in a human breast carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* *144*, 1197-1205.
- Flick, K., Ouni, I., Wohlschlegel, J. A., Capati, C., McDonald, W. H., Yates, J. R., and Kaiser, P. (2004). Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain. *Nat Cell Biol* *6*, 634-641.
- Galan, J. M., and Peter, M. (1999). Ubiquitin-dependent degradation of multiple F-box proteins by an autocatalytic mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 9124-9129.
- Gallant, P., Shii, Y., Cheng, P. F., Parkhurst, S. M., and Eisenman, R. N. (1996). Myc and Max homologs in Drosophila. *Science* *274*, 1523-1527.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 5547-5551.
- Gregory, M. A., and Hann, S. R. (2000). c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Mol Cell Biol* *20*, 2423-2435.
- Grignani, F., Lombardi, L., Inghirami, G., Sternas, L., Cechova, K., and Dalla-Favera, R. (1990). Negative autoregulation of c-myc gene expression is inactivated in transformed cells. *Embo J* *9*, 3913-3922.
- Grim, J. E., Gustafson, M. P., Hirata, R. K., Hagar, A. C., Swanger, J., Welcker, M., Hwang, H. C., Ericsson, J., Russell, D. W., and Clurman, B. E. (2008). Isoform- and cell cycle-dependent substrate degradation by the Fbw7 ubiquitin ligase. *J Cell Biol* *181*, 913-920.
- Hann, S. R. (2006). Role of post-translational modifications in regulating c-Myc proteolysis, transcriptional activity and biological function. *Semin Cancer Biol* *16*, 288-302.
- Hann, S. R., Abrams, H. D., Rohrschneider, L. R., and Eisenman, R. N. (1983). Proteins encoded by v-myc and c-myc oncogenes: identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma cell lines. *Cell* *34*, 789-798.
- 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.
- 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.

- Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-1512.
- Hemann, M. T., Bric, A., Teruya-Feldstein, J., Herbst, A., Nilsson, J. A., Cordon-Cardo, C., Cleveland, J. L., Tansey, W. P., and Lowe, S. W. (2005). Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. *Nature* 436, 807-811.
- Henriksson, M., Bakardjiev, A., Klein, G., and Luscher, B. (1993). Phosphorylation sites mapping in the N-terminal domain of c-myc modulate its transforming potential. *Oncogene* 8, 3199-3209.
- 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.
- Hermeking, H., Rago, C., Schuhmacher, M., Li, Q., Barrett, J. F., Obaya, A. J., O'Connell, B. C., Mateyak, M. K., Tam, W., Kohlhuber, F., *et al.* (2000). Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2229-2234.
- Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaioja, 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.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.
- Hiebert, S. W., Lipp, M., and Nevins, J. R. (1989). E1A-dependent trans-activation of the human MYC promoter is mediated by the E2F factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3594-3598.
- Hoeller, D., Hecker, C. M., and Dikic, I. (2006). Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 6, 776-788.
- Hong, F., Larrea, M. D., Doughty, C., Kwiatkowski, D. J., Squillace, R., and Slingerland, J. M. (2008). mTOR-raptor binds and activates SGK1 to regulate p27 phosphorylation. *Mol Cell* 30, 701-711.
- Inuzuka, H., Shaik, S., Onoyama, I., Gao, D., Tseng, A., Maser, R. S., Zhai, B., Wan, L., Gutierrez, A., Lau, A. W., *et al.* (2011). SCF(FBW7) regulates cellular apoptosis by targeting MCL1 for ubiquitylation and destruction. *Nature* 471, 104-109.
- Ioannidis, P., Trangas, T., Dimitriadis, E., Samiotaki, M., Kyriazoglou, I., Tsiapalis, C. M., Kittas, C., Agnantis, N., Nielsen, F. C., Nielsen, J., *et al.* (2001). C-MYC and IGF-II mRNA-binding protein (CRD-BP/IMP-1) in benign and malignant mesenchymal tumors. *Int J Cancer* 94, 480-484.

- Ishikawa, Y., Onoyama, I., Nakayama, K. I., and Nakayama, K. (2008). Notch-dependent cell cycle arrest and apoptosis in mouse embryonic fibroblasts lacking Fbxw7. *Oncogene* *27*, 6164-6174.
- Jackson, E. L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R. T., Crowley, D., Montoya, R., Jacks, T., and Tuveson, D. A. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* *15*, 3243-3248.
- 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.
- Joazeiro, C. A., and Weissman, A. M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* *102*, 549-552.
- Jones, T. R., and Cole, M. D. (1987). Rapid cytoplasmic turnover of c-myc mRNA: requirement of the 3' untranslated sequences. *Mol Cell Biol* *7*, 4513-4521.
- Kapuria, V., Peterson, L. F., Fang, D., Bornmann, W. G., Talpaz, M., and Donato, N. J. (2010). Deubiquitinase inhibition by small-molecule WP1130 triggers aggresome formation and tumor cell apoptosis. *Cancer Res* *70*, 9265-9276.
- Kelly, K., Cochran, B. H., Stiles, C. D., and Leder, P. (1983). Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* *35*, 603-610.
- Kiefer, J., Okret, S., Jondal, M., and McConkey, D. J. (1995). Functional glucocorticoid receptor expression is required for cAMP-mediated apoptosis in a human leukemic T cell line. *J Immunol* *155*, 4525-4528.
- 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.
- Kinsella, T. M., and Nolan, G. P. (1996). Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum Gene Ther* *7*, 1405-1413.
- Kirkpatrick, D. S., Hathaway, N. A., Hanna, J., Elsasser, S., Rush, J., Finley, D., King, R. W., and Gygi, S. P. (2006). Quantitative analysis of in vitro ubiquitinated cyclin B1 reveals complex chain topology. *Nat Cell Biol* *8*, 700-710.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *68*, 820-823.
- Kobayashi, T., and Cohen, P. (1999). Activation of serum- and glucocorticoid-regulated protein kinase by agonists that activate phosphatidylinositide 3-kinase is mediated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and PDK2. *Biochem J* *339* (Pt 2), 319-328.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U., and Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* *96*, 635-644.

- Koepp, D. M., Schaefer, L. K., Ye, X., Keyomarsi, K., Chu, C., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (2001). Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* *294*, 173-177.
- Komander, D., Clague, M. J., and Urbe, S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 550-563.
- Kon, N., Kobayashi, Y., Li, M., Brooks, C. L., Ludwig, T., and Gu, W. (2010). Inactivation of HAUSP in vivo modulates p53 function. *Oncogene* *29*, 1270-1279.
- Kress, T. R., Cannell, I. G., Brenkman, A. B., Samans, B., Gaestel, M., Roepman, P., Burgering, B. M., Bushell, M., Rosenwald, A., and Eilers, M. (2011). The MK5/PRAK kinase and Myc form a negative feedback loop that is disrupted during colorectal tumorigenesis. *Mol Cell* *41*, 445-457.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Leder, P., Battey, J., Lenoir, G., Moulding, C., Murphy, W., Potter, H., Stewart, T., and Taub, R. (1983). Translocations among antibody genes in human cancer. *Science* *222*, 765-771.
- Leung-Toung, R., Zhao, Y., Li, W., Tam, T. F., Karimian, K., and Spino, M. (2006). Thiol proteases: inhibitors and potential therapeutic targets. *Curr Med Chem* *13*, 547-581.
- Lewandoski, M., Wassarman, K. M., and Martin, G. R. (1997). Zp3-cre, a transgenic mouse line for the activation or inactivation of loxP-flanked target genes specifically in the female germ line. *Curr Biol* *7*, 148-151.
- Li, M., Brooks, C. L., Kon, N., and Gu, W. (2004). A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Mol Cell* *13*, 879-886.
- Li, X., Lu, Y., Jin, W., Liang, K., Mills, G. B., and Fan, Z. (2006). Autophosphorylation of Akt at threonine 72 and serine 246. A potential mechanism of regulation of Akt kinase activity. *J Biol Chem* *281*, 13837-13843.
- Li, Z., Wang, D., Messing, E. M., and Wu, G. (2005). VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1alpha. *EMBO Rep* *6*, 373-378.
- Lombardi, L., Grignani, F., Sternas, L., Cechova, K., Inghirami, G., and Dalla-Favera, R. (1990). Mechanism of negative feed-back regulation of c-myc gene expression in B-cells and its inactivation in tumor cells. *Curr Top Microbiol Immunol* *166*, 293-301.
- Luo, J., Solimini, N. L., and Elledge, S. J. (2009). Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* *136*, 823-837.
- 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.

- Maira, S. M., Stauffer, F., Brueggen, J., Furet, P., Schnell, C., Fritsch, C., Brachmann, S., Chene, P., De Pover, A., Schoemaker, K., *et al.* (2008). Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 7, 1851-1863.
- Mao, J. H., Kim, I. J., Wu, D., Climent, J., Kang, H. C., DelRosario, R., and Balmain, A. (2008). FBXW7 targets mTOR for degradation and cooperates with PTEN in tumor suppression. *Science* 321, 1499-1502.
- Marcu, K. B., Bossone, S. A., and Patel, A. J. (1992). myc function and regulation. *Annu Rev Biochem* 61, 809-860.
- 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., Van Buskirk, H. A., Dugan, K. A., Copeland, T. D., and Cole, M. D. (1998). The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* 94, 363-374.
- Meyer, N., and Penn, L. Z. (2008). Reflecting on 25 years with MYC. *Nat Rev Cancer* 8, 976-990.
- Mills, J. R., Hippo, Y., Robert, F., Chen, S. M., Malina, A., Lin, C. J., Trojahn, U., Wendel, H. G., Charest, A., Bronson, R. T., *et al.* (2008). mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10853-10858.
- Mo, J. S., Ann, E. J., Yoon, J. H., Jung, J., Choi, Y. H., Kim, H. Y., Ahn, J. S., Kim, S. M., Kim, M. Y., Hong, J. A., *et al.* (2011). Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) controls Notch1 signaling by downregulation of protein stability through Fbw7 ubiquitin ligase. *J Cell Sci* 124, 100-112.
- Morgenstern, J. P., and Land, H. (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* 18, 3587-3596.
- 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.
- Nakayama, K. I., and Nakayama, K. (2005). Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Semin Cell Dev Biol* 16, 323-333.
- Nateri, A. S., Riera-Sans, L., Da Costa, C., and Behrens, A. (2004). The ubiquitin ligase SCFFbw7 antagonizes apoptotic JNK signaling. *Science* 303, 1374-1378.

- 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.
- Niendorf, S., Oksche, A., Kisser, A., Lohler, J., Prinz, M., Schorle, H., Feller, S., Lewitzky, M., Horak, I., and Knobeloch, K. P. (2007). Essential role of ubiquitin-specific protease 8 for receptor tyrosine kinase stability and endocytic trafficking in vivo. *Mol Cell Biol* *27*, 5029-5039.
- Nijman, S. M., Luna-Vargas, M. P., Velds, A., Brummelkamp, T. R., Dirac, A. M., Sixma, T. K., and Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* *123*, 773-786.
- Nilsson, J. A., and Cleveland, J. L. (2003). Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* *22*, 9007-9021.
- Noubissi, F. K., Elcheva, I., Bhatia, N., Shakoory, A., Ougolkov, A., Liu, J., Minamoto, T., Ross, J., Fuchs, S. Y., and Spiegelman, V. S. (2006). CRD-BP mediates stabilization of betaTrCP1 and c-myc mRNA in response to beta-catenin signalling. *Nature* *441*, 898-901.
- Oberg, C., Li, J., Pauley, A., Wolf, E., Gurney, M., and Lendahl, U. (2001). The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J Biol Chem* *276*, 35847-35853.
- Onoyama, I., Tsunematsu, R., Matsumoto, A., Kimura, T., de Alboran, I. M., Nakayama, K., and Nakayama, K. I. (2007). Conditional inactivation of Fbxw7 impairs cell-cycle exit during T cell differentiation and results in lymphomatogenesis. *J Exp Med* *204*, 2875-2888.
- Pearce, L. R., Komander, D., and Alessi, D. R. (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 9-22.
- Penn, L. J., Brooks, M. W., Laufer, E. M., and Land, H. (1990). Negative autoregulation of c-myc transcription. *Embo J* *9*, 1113-1121.
- 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.
- Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* *70*, 503-533.
- Popov, N., Herold, S., Llamazares, M., Schülein, C., and Eilers, M. (2007a). Fbw7 and Usp28 regulate myc protein stability in response to DNA damage. *Cell Cycle* *6*, 2327-2331.
- Popov, N., Schülein, C., Jaenicke, L. A., and Eilers, M. (2010). Ubiquitylation of the amino terminus of Myc by SCF(beta-TrCP) antagonizes SCF(Fbw7)-mediated turnover. *Nat Cell Biol* *12*, 973-981.

- Popov, N., Wanzel, M., Madiredjo, M., Zhang, D., Beijersbergen, R., Bernards, R., Moll, R., Elledge, S. J., and Eilers, M. (2007b). The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability. *Nat Cell Biol* 9, 765-774.
- Prendergast, G. C. (1999). Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* 18, 2967-2987.
- Rajagopalan, H., Jallepalli, P. V., Rago, C., Velculescu, V. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Lengauer, C. (2004). Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature* 428, 77-81.
- Rous, P. (1911). A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J Exp Med* 13, 397-411.
- Sachdeva, M., Zhu, S., Wu, F., Wu, H., Walia, V., Kumar, S., Elble, R., Watabe, K., and Mo, Y. Y. (2009). p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 3207-3212.
- Salghetti, S. E., Kim, S. Y., and Tansey, W. P. (1999). Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *Embo J* 18, 717-726.
- Sampson, V. B., Rong, N. H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, N. J., Dunn, S. P., and Krueger, L. J. (2007). MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res* 67, 9762-9770.
- Schoenenberger, C. A., Andres, A. C., Groner, B., van der Valk, M., LeMeur, M., and Gerlinger, P. (1988). Targeted c-myc gene expression in mammary glands of transgenic mice induces mammary tumours with constitutive milk protein gene transcription. *Embo J* 7, 169-175.
- Schülein, C., and Eilers, M. (2009). An unsteady scaffold for Myc. *Embo J* 28, 453-454.
- Schülein, C., Eilers, M., and Popov, N. (2011). PI3K-dependent phosphorylation of Fbw7 modulates substrate degradation and activity. *FEBS Lett* 585, 2151-2157.
- Schulman, B. A., and Harper, J. W. (2009). Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 319-331.
- Schwab, M., Ellison, J., Busch, M., Rosenau, W., Varmus, H. E., and Bishop, J. M. (1984). Enhanced expression of the human gene N-myc consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 4940-4944.
- Schwarz, S. E., Rosa, J. L., and Scheffner, M. (1998). Characterization of human hect domain family members and their interaction with UbcH5 and UbcH7. *J Biol Chem* 273, 12148-12154.
- Sears, R., Leone, G., DeGregori, J., and Nevins, J. R. (1999). Ras enhances Myc protein stability. *Mol Cell* 3, 169-179.

- 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.
- Sheiness, D., Fanshier, L., and Bishop, J. M. (1978). Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. *J Virol* *28*, 600-610.
- Sherk, A. B., Frigo, D. E., Schnackenberg, C. G., Bray, J. D., Laping, N. J., Trizna, W., Hammond, M., Patterson, J. R., Thompson, S. K., Kazmin, D., *et al.* (2008). Development of a small-molecule serum- and glucocorticoid-regulated kinase-1 antagonist and its evaluation as a prostate cancer therapeutic. *Cancer Res* *68*, 7475-7483.
- Sherr, C. J., and DePinho, R. A. (2000). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* *102*, 407-410.
- Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* *91*, 325-334.
- Soucek, L., Whitfield, J., Martins, C. P., Finch, A. J., Murphy, D. J., Sodikin, 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.
- Spencer, C. A., and Groudine, M. (1991). Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv Cancer Res* *56*, 1-48.
- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F., and Eilers, M. (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* *3*, 392-399.
- Stone, J., de Lange, T., Ramsay, G., Jakobovits, E., Bishop, J. M., Varmus, H., and Lee, W. (1987). Definition of regions in human c-myc that are involved in transformation and nuclear localization. *Mol Cell Biol* *7*, 1697-1709.
- Strohmaier, H., Spruck, C. H., Kaiser, P., Won, K. A., Sangfelt, O., and Reed, S. I. (2001). Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature* *413*, 316-322.
- Sundqvist, A., Bengoechea-Alonso, M. T., Ye, X., Lukiyanchuk, V., Jin, J., Harper, J. W., and Ericsson, J. (2005). Control of lipid metabolism by phosphorylation-dependent degradation of the SREBP family of transcription factors by SCF(Fbw7). *Cell Metab* *1*, 379-391.
- Swanstrom, R., Parker, R. C., Varmus, H. E., and Bishop, J. M. (1983). Transduction of a cellular oncogene: the genesis of Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *80*, 2519-2523.

- Tang, X., Orlicky, S., Lin, Z., Willems, A., Neculai, D., Ceccarelli, D., Mercurio, F., Shilton, B. H., Sicheri, F., and Tyers, M. (2007). Suprafacial orientation of the SCFCdc4 dimer accommodates multiple geometries for substrate ubiquitination. *Cell* *129*, 1165-1176.
- Tetzlaff, M. T., Yu, W., Li, M., Zhang, P., Finegold, M., Mahon, K., Harper, J. W., Schwartz, R. J., and Elledge, S. J. (2004). Defective cardiovascular development and elevated cyclin E and Notch proteins in mice lacking the Fbw7 F-box protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 3338-3345.
- Thalmeier, K., Synovzik, H., Mertz, R., Winnacker, E. L., and Lipp, M. (1989). Nuclear factor E2F mediates basic transcription and trans-activation by E1a of the human MYC promoter. *Genes Dev* *3*, 527-536.
- Thompson, C. B., Challoner, P. B., Neiman, P. E., and Groudine, M. (1985). Levels of c-myc oncogene mRNA are invariant throughout the cell cycle. *Nature* *314*, 363-366.
- Todaro, G. J., and Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* *17*, 299-313.
- Tsunematsu, R., Nakayama, K., Oike, Y., Nishiyama, M., Ishida, N., Hatakeyama, S., Bessho, Y., Kageyama, R., Suda, T., and Nakayama, K. I. (2004). Mouse Fbw7/Sel-10/Cdc4 is required for notch degradation during vascular development. *J Biol Chem* *279*, 9417-9423.
- Valero, R., Bayes, M., Francisca Sanchez-Font, M., Gonzalez-Angulo, O., Gonzalez-Duarte, R., and Marfany, G. (2001). Characterization of alternatively spliced products and tissue-specific isoforms of USP28 and USP25. *Genome Biol* *2*, RESEARCH0043.
- van Drogen, F., Sangfelt, O., Malyukova, A., Matskova, L., Yeh, E., Means, A. R., and Reed, S. I. (2006). Ubiquitylation of cyclin E requires the sequential function of SCF complexes containing distinct hCdc4 isoforms. *Mol Cell* *23*, 37-48.
- Vennstrom, B., Sheiness, D., Zabielski, J., and Bishop, J. M. (1982). Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus strain 29. *J Virol* *42*, 773-779.
- Vervoorts, J., Luscher-Firzlaff, J., and Luscher, B. (2006). The ins and outs of MYC regulation by posttranslational mechanisms. *J Biol Chem* *281*, 34725-34729.
- 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.
- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y., and Brown, R. F. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* *269*, 5241-5248.
- 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.

Vooijs, M., Jonkers, J., and Berns, A. (2001). A highly efficient ligand-regulated Cre recombinase mouse line shows that LoxP recombination is position dependent. *EMBO Rep* *2*, 292-297.

Walworth, N. C., and Bernards, R. (1996). rad-dependent response of the chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. *Science* *271*, 353-356.

Weinberg, R. A. (2007). *The biology of cancer*, (New York ; London: Garland Science).

Weinstein, I. B. (2002). Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* *297*, 63-64.

Welcker, M., and Clurman, B. E. (2007). Fbw7/hCDC4 dimerization regulates its substrate interactions. *Cell Div* *2*, 7.

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.

Welcker, M., Larimore, E. A., Frappier, L., and Clurman, B. E. (2011). Nucleolar targeting of the fbw7 ubiquitin ligase by a pseudosubstrate and glycogen synthase kinase 3. *Mol Cell Biol* *31*, 1214-1224.

Welcker, M., Orian, A., Grim, J. E., Eisenman, R. N., and Clurman, B. E. (2004a). A nucleolar isoform of the Fbw7 ubiquitin ligase regulates c-Myc and cell size. *Curr Biol* *14*, 1852-1857.

Welcker, M., Orian, A., Jin, J., Grim, J. E., Harper, J. W., Eisenman, R. N., and Clurman, B. E. (2004b). The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 9085-9090.

Wertz, I. E., Kusam, S., Lam, C., Okamoto, T., Sandoval, W., Anderson, D. J., Helgason, E., Ernst, J. A., Eby, M., Liu, J., *et al.* (2011). Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature* *471*, 110-114.

Wickliffe, K. E., Lorenz, S., Wemmer, D. E., Kuriyan, J., and Rape, M. (2011). The mechanism of linkage-specific ubiquitin chain elongation by a single-subunit E2. *Cell* *144*, 769-781.

Wierstra, I., and Alves, J. (2008). The c-myc promoter: still MysterY and challenge. *Adv Cancer Res* *99*, 113-333.

Wood, M. A., McMahon, S. B., and Cole, M. D. (2000). An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol Cell* *5*, 321-330.

Xu, P., Duong, D. M., Seyfried, N. T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., and Peng, J. (2009). Quantitative proteomics reveals the

function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* *137*, 133-145.

Yada, M., Hatakeyama, S., Kamura, T., Nishiyama, M., Tsunematsu, R., Imaki, H., Ishida, N., Okumura, F., Nakayama, K., and Nakayama, K. I. (2004). Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *Embo J* *23*, 2116-2125.

Ye, Y., and Rape, M. (2009). Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 755-764.

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.

Zeller, K. I., Zhao, X., Lee, C. W., Chiu, K. P., Yao, F., Yustein, J. T., Ooi, H. S., Orlov, Y. L., Shahab, A., Yong, H. C., *et al.* (2006). Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 17834-17839.

Zhang, D., Zaugg, K., Mak, T. W., and Elledge, S. J. (2006). A role for the deubiquitinating enzyme USP28 in control of the DNA-damage response. *Cell* *126*, 529-542.

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.

Zindy, F., Quelle, D. E., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (1997). Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* *15*, 203-211.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Alanin
Abb.	Abbildung
AGO	Archipelago
Akt	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
ARF	<i>alternate reading frame</i>
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATM	<i>Ataxia teleangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>Ataxia teleangiectasia and Rad3-related protein</i>
B2M	Beta-2-Microglobulin
BET	<i>bromodomain and extra-terminal</i>
BL21	Bakterienstamm zur Expression von GST-Fusionsproteinen
bleo	Bleomycin
bp	Basenpaare
BR	basische Region
β -TrCP	<i>beta-transducin repeat containing protein</i>
c	zenti
c-	<i>cellular</i>
°C	Grad Celsius
CDC	<i>cell division cycle</i>
Cdk	<i>cyclin-dependent kinase</i> ; Zyklin-abhängige Kinase
CDKN1A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i> (p21)
CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i> (p27)
CDKN2B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B</i> (p15)

CCND2	<i>G1/S-specific cyclin D2</i> ; Zyklin D2
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
CDS	<i>coding sequence</i> ; kodierende Sequenz
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
ChIP-seq	Hochdurchsatzsequenzieren von DNA aus ChIP-Experimenten
CHX	Cycloheximid
Ci	Curie; Einheit der Aktivität eines radioaktiven Stoffes
CMV	Cytomegalievirus
CPD	CDC4-Phospho-Degron
Cre	<i>cyclization recombination</i>
CRD-BP	<i>coding region determinant-binding protein</i>
CUL	Cullin
D	Asparaginsäure
D	Dimerisierung
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DH5 α	Bakterienstamm zur Amplifikation von DNA-Plasmiden
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxiribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribinukleotidtriphosphat-Gemisch
DTT	Dithiothreitol
DUB	<i>deubiquitinating enzyme</i>
E	Glutaminsäure
E	Tag der Embryonalentwicklung
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Ligase
E4	<i>ubiquitin-chain elongation factor</i>
E1A	adenovirales Protein E1A
E2F	<i>transcription factor activating adenovirus E2 gene</i>
eco	ekotroph

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E μ	<i>Enhancer</i> der schweren Immunglobulinkette
<i>env</i>	<i>envelope protein</i>
ER	<i>estrogen receptor</i> ; Östrogenrezeptor
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i> ; Durchflusszytometrie
FBS	<i>fetal bovine serum</i> ; fötales Kälberserum
Fbw7	<i>F-box and WD repeat domain-containing 7</i>
fl	<i>floxed</i>
for	<i>forward</i> ; 5'-Primer
Fox	<i>Forkhead-Box</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G0-Phase	<i>Gap0-Phase</i>
G1-Phase	<i>Gap1-Phase</i>
G2-Phase	<i>Gap2-Phase</i>
<i>gag</i>	<i>group antigens</i>
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 beta
GST	Gluthation-S-Transferase
h	Stunde(n)
H	Homo sapiens
HA	Hämagglutinin
HBS	<i>HEPES-buffered saline</i> ; HEPES-gepufferte Salzlösung
HECT	<i>homologous to the E6-AP carboxy-terminus</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
His	Histidin
HLH	<i>Helix-Loop-Helix-Motiv</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
hygro	Hygromycin
I	Isoleucin
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid

IRES	<i>internal ribosomal entry site</i> ; interne ribosomale Eintrittsstelle
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
L	Leucin
<i>large T</i>	transformierendes Antigen des SV40 Virus
LB	<i>lysogeny broth</i> ; Nährmedium zur Bakterienkultur
L-Myc	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived</i>
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
LoxP	<i>locus of X-over P1</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
Lys	Lysin
LZ	<i>Leucin-Zipper</i>
m	Meter
m	milli
μ	mikro
M	molar
M	Mus musculus
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Max	<i>Myc-associated factor X</i>
MC29	aviäres Myelozytomatose Virus
Mcl1	<i>myeloid cell leukemia sequence 1</i>
Mdm2	<i>mouse double minute chromosome 2</i>
MEF	muriner embryonaler Fibroblast
MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i>
Min	Minute(n)
miRNA	microRNA
Miz1	<i>Myc-interacting zinc finger protein 1</i>
MK5	<i>MAPKAPK5; mitogen-activated protein kinase activated protein kinase 5</i>
Mo-MuLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
M-Phase	Mitosephase

mRNA	<i>messenger RNA</i> ; Boten-RNA
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
Myc	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
n	nano
n	Probenzahl
NEDD8	<i>neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 8</i>
NEM	N-Ethylmaleimid
NLS	nukleäres Lokalisierungssignal
N-Myc	<i>v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
Notch	von englisch <i>notches</i> (Kerben)
NP-40	Nonidet P-40
OHT	Hydroxytamoxifen
p	Protein
P	Phosphat
P	Promotor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PHX	Phoenix; Zelllinie zur Herstellung von ekotrophen Retroviren
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIN1	<i>peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i>
PKB	Proteinkinase B (Akt)
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
<i>pol</i>	<i>protease, reverse transcriptase, integrase</i>
PP2A	Protein-Phosphatase 2A
Pro	Prolin
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
puro	Puromycin

PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-PCR
R	Arginin
Raf	<i>Rat fibrosarcoma</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
Rb	<i>retinoblastoma protein</i>
RBX1	<i>Ring-box 1</i>
rev	<i>reverse</i> ; 3'-Primer
RING	<i>really interesting new gene</i>
RIPA	<i>radio immunprecipitation assay</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> ; Zellkulturmedium
RSV	<i>Rous Sarkoma Virus</i>
RT	Reverse Transkriptase
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	Sekunde(n)
S	Serin
S	Svedberg; Sedimentationskoeffizient
SCF	<i>Skp1-Cullin-F-Box-protein-containing complex</i>
SD	<i>standard deviation</i> ; Standardabweichung
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
SGK	Serum- und Glukokortikoid-regulierte Kinase
shRNA	<i>short hairpin RNA</i> ; Haarnadel-RNA
Skp	<i>S-phase kinase-associated protein</i>
S-Phase	Synthese-Phase
src	<i>sarcoma</i>
SREBP1	<i>sterol regulatory element-binding protein 1</i>
subG1	Zellen mit einem geringeren DNA-Gehalt als in der G1-Phase, apoptotische Zellen
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>

SV40	<i>simian virus 40</i> ; Affenvirus 40
T	Threonin
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris/Azetat/EDTA-Puffer
T-ALL	akute lymphatische Leukämie der T-Zellen
TBS	<i>tris buffered saline</i> ; Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	<i>tris buffered saline with Tween-20</i> ; Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
Tcf-4	<i>T-cell factor 4</i>
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF β	transforming growth factor beta
Thr	Threonin
TIP48	TBP interacting protein, 48 kDa
TIP49	TBP interacting protein, 49 kDa
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
TRRAP	<i>transactivation/transformation-associated protein</i>
TRUSS	<i>tumor necrosis factor receptor-associated ubiquitous scaffolding and signaling protein</i>
U	Uridin
UBA	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
UBC	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
USP	Ubiquitin-spezifische Protease
UTR	untranslatierte Region
UVB	Ultraviolettlicht im Wellenlängenbereich von 280 bis 315 nm
v-	<i>viral</i>
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i> ; Volumen pro Volumeneinheit
VHL	von Hippel-Lindau
w/v	<i>weight/volume</i> ; Gewicht pro Volumeneinheit
WB	Western Blot
Wnt	zusammengesetzt aus Wg für <i>Wingless</i> und Int-1
WT	Wildtyp

XL1	Bakterienstamm zur Amplifikation von DNA-Plasmiden
Zp3	Zona pellucida 3

9.2 Publikationen

Popov N, Herold S, Llamazares M, Schülein C, Eilers M (2007). Fbw7 and Usp28 regulate myc protein stability in response to DNA damage. *Cell Cycle*. 2007 Oct 1;6 (19):2327-31.

Schülein C, Eilers M (2009). An unsteady scaffold for Myc. *EMBO J*. 2009 Mar 4;28 (5):453-4.

Popov N, Schülein C, Jaenicke LA, Eilers M (2010). Ubiquitylation of the amino terminus of Myc by SCF(β -TrCP) antagonizes SCF(Fbw7)-mediated turnover. *Nat Cell Biol*. 2010 Oct;12 (10):973-81.

Schülein C, Eilers M, Popov N (2011). PI3K-dependent phosphorylation of Fbw7 modulates substrate degradation and activity. *FEBS Lett*. 2011 Jul 21;585 (14):2151-7.

9.3 Lebenslauf

9.4 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Martin Eilers nicht nur für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, sondern auch für die kontinuierliche Unterstützung und Förderung, sowie für die ständige Gesprächsbereitschaft und Geduld.

Außerdem danke ich den weiteren Mitgliedern meines Supervisory Committees, Prof. Dr. Dr. Manfred Scharl, Prof. Dr. Stefan Gaubatz und Prof. Dr. Thorsten Hoppe für die Betreuung meiner Doktorarbeit und für die hilfreichen Vorschläge und Anregungen in meinem Thesis Committee.

Prof. Dr. Manfred Gessler danke ich für die Übernahme des Vorsitzes bei meinem Promotionsverfahren.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Nikita Popov, der mir während der gesamten Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand, mich immer wieder motiviert hat und von dem ich so viel lernen konnte.

Vielen Dank an alle meine momentanen und ehemaligen Kollegen und Kolleginnen aus Marburg und Würzburg für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfe und Unterstützung.

Besonders Anne, die seit dem ersten Tag unseres Studiums im Herbst 2002 diesen Weg mit mir geht, möchte ich für ihre Freundschaft und Loyalität herzlich danken.

Danke an die Mensa-Truppe für die gute Gesellschaft beim Mittagessen und an Steffi für viele aufbauende Tassen Kaffee.

Danke an Renate, die gute Seele unseres Labors, Rosemarie für die Unterstützung bei allem Organisatorischen, Angela für die Hilfe bei der Mausearbeit und an meine Mädels Steffi, Anne, Steffi, Suse, Katrin, Laura, und Theresia; ohne euch wäre das alles halb so schön gewesen!

Danke an Steffi, Katrin, Nikita, Anne, Laura, meinen Papa und meinen Mann für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, meiner Oma, meiner Schwester und meinem Mann dafür, dass sie immer für mich da sind.

9.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation

**Die Regulation von Fbw7 durch PI3K-abhängige Phosphorylierung
und
Charakterisierung eines konditionalen Usp28-Knockout-Mausmodells**

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

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

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled

**Regulation of Fbw7 by PI3K-dependent phosphorylation
and
Characterization of a Usp28 conditional knockout mouse**

is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature