

Philipps



**Universität
Marburg**

**Identifizierung von *bona fide*
Interaktionspartnern der
Transkriptionsfaktoren
c-Myc und Miz-1**

Dissertation

zur

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

dem

Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Jens – Peter Reese
aus Marburg

Marburg / Lahn 2008

Vom Fachbereich Biologie

Der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am.....angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Klaus Lingelbach

Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Martin Eilers

Tag der mündlichen Prüfung:

1	Einleitung	1
1.1	<i>Die myc Genfamilie</i>	2
1.2	<i>Die Struktur von c-Myc</i>	3
1.2.1	Die aminoternale Domäne von c-Myc	3
1.2.2	Die Zentralregion von c-Myc	4
1.2.3	Die carboxyterminale Domäne von c-Myc	4
1.3	<i>Protein-Protein Interaktionen von c-Myc</i>	6
1.4	<i>Der Miz-1 Transkriptionsfaktor</i>	11
1.5	<i>Interaktionspartner von Miz-1</i>	12
1.6	<i>Die Regulation der Transkription durch c-Myc</i>	14
1.6.1	Transkriptionelle Aktivierung durch c-Myc	14
1.6.2	Mechanismen der Reprimierung durch c-Myc	17
1.7	<i>Die Funktion von c-Myc in Physiologie und Tumorigenese</i>	20
1.7.1	Zellzykluskontrolle	21
1.7.2	Zellwachstum	21
1.7.3	Zelldifferenzierung, Adhäsion und Angiogenese	22
1.7.4	c-Myc und Apoptose	23
1.7.5	Zelluläre Transformation durch c-Myc	24
1.8	<i>Fragestellung</i>	26
2	Material & Methoden	28
2.1	<i>Material</i>	28
2.1.1	Bakterienstämme und Säugerzellen	28
2.1.2	Primer für die Klonierung	28
2.1.3	Plasmide	29
2.1.4	Allgemeine Lösungen	30
2.1.5	Allgemeine Puffer	31
2.1.6	Chemikalien	33
2.1.7	Molekulargewichtsmarker	33
2.1.8	Enzyme	34
2.1.9	Filme, Filter und Geräte	34
2.1.10	Antikörper	35
2.1.11	Kit-Systeme	35
2.2	<i>Methoden</i>	36
2.2.1	Bakterienzellkultur	36
2.2.2	Säugerzellkultur	37
2.2.3	Arbeiten mit Nukleinsäuren	39
2.2.4	Arbeiten mit Proteinen	41
2.2.5	Chromatographische Fraktionierung von Komplexen Miz-1/Myc Untereinheiten	49
2.2.6	Tandem-Affinitäts-Aufreinigung	51
3	Ergebnisse	56
3.1	<i>Tandem-Affinitäts-Aufreinigung</i>	56
3.1.1	Synthese des Miz-1-TAP Fusionsproteins	56
3.1.2	Funktionalität des Miz-1-TAP Konstrukts	56
3.1.3	Miz-1-TAP Aufreinigung im analytischen Maßstab	58
3.1.4	Das Chaperon Hsp70 als möglicher Interaktionspartner von Miz-1	61
3.1.5	Miz-1 erscheint in drei Banden unterschiedlichen Molekulargewichts	63
3.1.6	Zusammenfassung Tandem-Affinitäts-Aufreinigung	63
3.2	<i>Fraktionierung und LC-MS/MS</i>	65
3.2.1	Etablierung des Anreicherungsschemas	65
3.2.2	Miz-1 und c-Myc eluieren gemeinsam in der PC-C Fraktion	66

3.3	<i>Miz-1 tritt in Komplexen auf</i>	68
3.3.1	Elutionsverhalten von Miz-1 und c-Myc mit MiniS und MiniQ Säulen.....	69
3.3.2	Präparatives Fraktionierungsschema	71
3.3.3	Unterschiedliche Fraktionen für die LC-MS/MS.....	73
3.4	<i>Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchungen</i>	75
4	Diskussion	91
4.1	<i>Tandem-Affinitäts-Aufreinigung</i>	93
4.1.1	Miz-1 Interaktion mit Hsp70	95
4.1.2	Verschiedene Genprodukte von Miz-1?	96
4.1.3	Tandem-Affinitäts-Aufreinigung: Schlussfolgerung und Ausblick.....	97
4.2	<i>LC-MS Identifizierung von bona fide Interaktionen mit c-Myc bzw. Miz-1</i>	97
4.2.1	Etablierung des Fraktionierungsschemas.....	98
4.2.2	Potentielle Protein-Protein Interaktionspartner von c-Myc bzw. Miz-1	99
4.2.3	Transkriptionsfaktoren und/oder Chromatin-Remodelling-Komplexe	100
4.2.4	Untereinheiten der basalen RNA Polymerase-Maschinerie.....	101
4.2.5	Faktoren der RNA-Prozessierung.	102
4.2.6	DNA-Reparaturfaktoren.	104
4.2.7	Faktoren anderer zellulärer Mechanismen	105
4.2.8	Methodische Bewertung	107
4.2.9	Fraktionierung: Schlussfolgerung und Ausblick.....	110
5	Zusammenfassung	111
6	Literatur	112
7	Abkürzungen	130
8	Danksagung	133
9	Curriculum vitae	134

1 Einleitung

Nahezu jeder molekularbiologische Prozess wird mit Hilfe von Multiproteinkomplexen organisiert und gesteuert. Bei der Umsetzung der im Genom gespeicherten Information, der Genexpression, ist ein besonders hoher Organisationsgrad der verschiedenen Abläufe notwendig. Bei jedem Schritt der Genexpression, beginnend mit der Transkription, über die Prozessierung der mRNA und deren Transport ins Cytoplasma, über die Translation bis hin zur Faltung der Polypeptidketten zum funktionsfähigen Protein, sind Multiproteinkomplexe beteiligt.

Der modulare Aufbau solcher Komplexe ermöglicht, bestimmte Aufgaben, wie die Transkriptionsaktivierung, an spezifischen Genorten mit unterschiedlichen Expressionsniveaus auszuführen. Durch Austausch von spezifischen Untereinheiten oder Adapterproteinen kann ein Aktivatorkomplex an unterschiedlichen Promotoren binden. Das gewährleistet eine kontrollierte Genexpression durch einen der drei RNA-Polymerasekomplexe (PolI, II, III).

Obwohl einige Proteinkomplexe identifiziert und ihre Funktionen in den letzten Jahren teilweise aufgeklärt werden konnten, sind weiterhin viele Fragen offen. Im Besonderen ist das Zusammenwirken verschiedener Komplexe auf unterschiedlichen Ebenen der Genexpression kaum untersucht. Bestimmte Transkriptionsfaktoren, wie etwa c-Myc, sind an einer ganzen Reihe von unterschiedlichen Vorgängen in der Zelle beteiligt, wo sie regulatorische Interaktionen mit verschiedenen Proteinkomplexen eingehen. So wird die Expression verschiedener Gene durch c-Myc aktiviert, andere Gene werden hingegen durch die Repressorfunktion von c-Myc an ihrer Expression gehindert. Um diese Aktivator- und Repressorfunktionen wahrzunehmen, interagiert c-Myc mit unterschiedlichen Multiproteinkomplexen. Darüber hinaus wird die Aktivität von c-Myc selbst über Komplexe, z. B. bei seiner Degradation durch Proteasomen, reguliert.

Da c-Myc an einer Vielzahl von regulativen Prozessen in Zellen beteiligt ist und Tumore sich über multiple genetische und zelluläre Veränderungen entwickeln, kommt c-Myc eine große Bedeutung bei der Krebsentstehung (Tumorigenese) zu. Nach Hanahan und Weinberg müssen Wildtypzellen sechs Eigenschaften schrittweise erwerben, um zu Tumorzellen zu transformieren¹:

- 1) Autonomie in Bezug auf wachstumsstimulierende Signale

- 2) Verringerte Empfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen
- 3) Unterdrückung des programmierten Zelltods (Apoptose)
- 4) Unbegrenzt replikatives Potential (Immortalisierung)
- 5) Stimulation der Angiogenese
- 6) Invasion von Geweben und Metastasierung.

Die unkontrollierte c-Myc Expression trägt zu fast allen Aspekten der Tumorentstehung bei. So kann c-Myc einerseits die uneingeschränkte Zellproliferation antreiben, die Zelldifferenzierung inhibieren, das Zellwachstum und die Angiogenese begünstigen, die Adhäsion von Zellen vermindern und auch die Metastasierung sowie die genetische Instabilität begünstigen. Andererseits löst der Verlust von c-Myc eine Hemmung der Zellproliferation und des Zellwachstums aus, die Differenzierung und die Zelladhäsion werden verstärkt.

Bei der Vielzahl von Einflüssen auf diverse Mechanismen der Krebsentstehung ist eine Beteiligung von c-Myc in verschiedenen Multiproteinkomplexen nahe liegend und bereits nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit ist die Interaktion von c-Myc und Miz-1 von besonderem Interesse. Im Zusammenspiel dieser beiden Transkriptionsfaktoren übt c-Myc eine reprimierende Funktion aus. Ziel dieser Arbeit ist, mittels proteinbiochemischer Methoden direkte Interaktionspartner des Miz-1 Proteins zu identifizieren, um die Mechanismen des reprimierenden Miz-1/c-Myc Komplexes aufklären zu können. Außerdem verfolgt ein weniger spezifischer Ansatz das Ziel, Komplexe, in denen c-Myc und Miz-1 enthalten sind, anzureichern und deren Komponenten zu identifizieren.

1.1 Die myc Genfamilie

Die *myc* Genfamilie besteht aus den fünf Genen - *c-myc*, *N-myc*, *L-myc*, *S-myc* und *B-myc*. Neben dem Proto-Onkogen *c-myc* sind weitere Mitglieder der Myc Familie mit der Tumorentstehung assoziiert ². Amplifikationen von *N-myc* finden sich beim Neuroblastom, einem Tumor der im Kindesalter entsteht ^{3,4}. Amplifiziertes *L-myc* ist bei kleinzelligen Lungenkarzinomen nachweisbar ⁵.

Entdeckt wurde *c-myc* als Homologon des *v-myc* Onkogens, das als retrovirales Gen bei Vögeln die Myelocytomatose auslösen kann ⁶. c-Myc ist für die Embryogenese essentiell. Embryos, die kein c-Myc exprimieren sterben vor Tag 10,5 ⁷.

Als stark konserviertes Gen⁸ ist *myc* in *Drosophila*, im Zebrafisch und vielen weiteren *Vertebrata* beschrieben⁹.

Das Proto-Onkogen *c-myc* trägt zur Entstehung des Burkitt-Lymphoms, einem B-Zell Tumor, entscheidend bei. Die erhöhte Expression von *c-myc* bei dieser Tumorart wird durch eine chromosomale Translokation induziert, bei der das *c-myc* Gen unter die Kontrolle eines „Enhancers“ von Immunglobulin-Promotoren gerät^{10, 11}. Eine charakteristische Überexpression von *c-myc* findet sich ebenfalls in Prostata Tumoren^{12, 13}, in Kolonkarzinomen^{14, 15} und in Melanomen^{16, 17}. In der Krebsdiagnostik ist die Amplifikation des *c-myc* Gens mit einer schlechten Prognose für den Patienten assoziiert^{18, 19}. Neueste Daten haben *c-Myc* als wichtiges Bindeglied bei Krebsarten identifiziert, die eine Folge des Verlustes der *Apc* (adenomatous polyposis coli tumor suppressor) Funktion sind. Die gezielte Inaktivierung von *c-myc* in Darmepithelzellen von Mäusen unterdrückt die Ausbildung des Phänotyps, der in *Apc* defizienten Darmepithelzellen beobachtet wurde²⁰⁻²².

1.2 Die Struktur von *c-Myc*

c-Myc ist ein Transkriptionsfaktor der Helix-Loop-Helix/Leuzin-Zipper Familie und vorrangig im Nukleus lokalisiert²³. Die Proteinsynthese findet während aller Phasen des Zellzyklus statt; das Expressionsniveau folgt dabei keiner Zyklik²⁴. *c-myc* gehört zur Gruppe der „immediate early response“ Gene, die in ruhenden Zellen durch Wachstumsfaktoren (Mitogene) transkriptionell aktiviert werden^{25, 26}.

c-Myc ist ein Phosphoprotein mit natürlich vorkommenden Isoformen, die durch Initiation der Translation an unterschiedlichen Startpunkten entstehen. Die überwiegend auftretende Polypeptidkette (439 AS) hat ein Molekulargewicht von 64 kDa. Eine weitere, 14 AS größere Polypeptidkette, deren Translationsstart an einem CUG-Startcodon am Ende des ersten Exons liegt, besitzt ein Molekulargewicht von 67 kDa. Durch Translationsinitiation an dem näher am 3' Ende gelegenen AUG Codon werden in verschiedenen Zelllinien weitere aminoterminal verkürzte Polypeptide translatiert, die mit *Myc S* (*S-Myc*) bezeichnet werden. Deren biologische Relevanz ist bislang nicht geklärt²⁷.

1.2.1 Die aminoterminal Domäne von *c-Myc*

Im Aminoterminus befindet sich eine Transaktivierungsdomäne (AS 1-134)²⁸, die zwei konservierte Elemente, die so genannten *Myc* Boxen (MB) I und II, enthält. Es

sind bislang vier Myc Boxen identifiziert. Die Analyse der biologischen Funktionen der Myc Boxen lieferte wichtige Informationen über die zellulären Effekte von c-Myc. In MB I liegen die Aminosäurereste Thr58 und Ser62; über deren zellzyklusabhängige Phosphorylierung durch Ras-abhängige Kinasen wird die Stabilität von c-Myc kontrolliert²⁹⁻³¹. Dabei haben die Phosphorylierungsstellen gegensätzliche Funktionen: Durch Aktivierung über den Ras Signalweg wird c-Myc an Ser62 phosphoryliert, was zur Stabilisierung von c-Myc führt. Im Gegensatz dazu destabilisiert die Phosphorylierung an Thr58 das c-Myc Protein und verstärkt seinerseits die Dephosphorylierung an Ser62. Thr58 wird durch Gsk3 (glykogen synthase kinase-3) phosphoryliert³². Ras inhibiert Gsk3 über den PI3K Signalweg und stabilisiert auf diese Weise c-Myc. Die Ubiquitin-E3-Ligase Scf-Fbw7 kann das an Thr58 phosphorylierte c-Myc erkennen und über die Ubiquitinierung zum proteasomalen Abbau von c-Myc führen³³⁻³⁵. In vielen Lymphomen wurden Punktmutationen an Thr58 gefunden, wodurch die destabilisierende Phosphorylierung an c-Myc nicht mehr möglich ist. c-Myc ist damit resistent gegenüber dem proteasomalen Abbau durch Scf-Fbw7³⁶.

Die hydrophobe MB II ist, wie MB I, eine Bindestelle für viele Interaktionspartner und essentiell für die meisten bekannten physiologischen Funktionen von c-Myc einschließlich der Transkriptionsregulation, der Transformation, der Blockierung der Differenzierung, der Apoptose und der c-Myc Autoregulation.

1.2.2 Die Zentralregion von c-Myc

In der Zentralregion von c-Myc (AS 144-354) wurden zwei weitere konservierte Sequenzelemente, die Myc Boxen III und IV, entdeckt. MB III ist zwar notwendig für die Transformation, ihre Deletion jedoch verstärkt die c-Myc abhängige Apoptose³⁷. MB IV ist ebenfalls notwendig für die Transformation; ihre Deletion verstärkt den c-Myc induzierten G₂ Arrest. Mutanten in diesen c-Myc Boxen führen zu Defekten bei Aktivierung und Repression einer Reihe von c-Myc Zielgenen³⁸.

1.2.3 Die carboxyterminale Domäne von c-Myc

Im Carboxyterminus des c-Myc Proteins ist eine basische Region zu finden, gefolgt von einer Helix-Loop-Helix (bHLH) Domäne³⁹ sowie einem Leuzin-Zipper-Motiv (LZ)⁴⁰. Für die sequenzspezifische DNA-Bindung der c-Myc Proteine ist die basische Region (AS 355-367) notwendig⁴¹. Das Helix-Loop-Helix (AS 368-410)

Einleitung

sowie das Leuzin-Zipper-Motiv (AS 410-439) sind Dimerisierungsregionen für die Bindung der c-Myc Proteine an weitere Proteine, allen voran Max, einem eng verwandten bHLHZ Protein ⁴². Röntgenuntersuchungen der c-Myc/Max Dimere zeigten, dass zwei c-Myc/Max Heterodimere selbst wiederum in Form eines bivalenten, antiparallelen Heterotetramers dimerisieren. Eine mögliche DNA-Schleifenbildung mittels Tetramerisierung und anschließender Bindung an E-Box-DNA-Sequenzen könnte erklären, warum c-Myc die Genexpression von Promotoren aktivieren kann, deren E-Boxen weit auseinander liegen ⁴³.

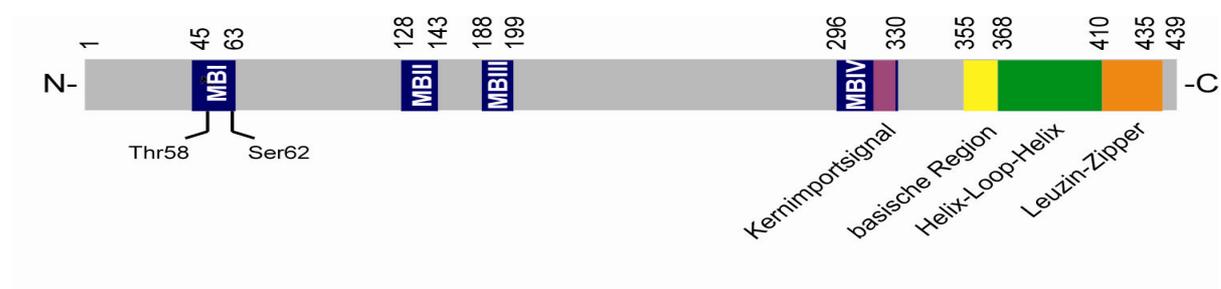


Abbildung 1. Sequenzelemente des c-Myc Proteins. Blau: Myc Boxen I-IV. In Myc Box I befinden sich die wichtigen Phosphorylierungsstellen Thr58 und Ser62.

1.3 Protein-Protein Interaktionen von c-Myc

Die Protein-Protein Interaktionen des c-Myc Proteins machen die physiologische Funktion von c-Myc erst möglich. Einige Interaktionspartner von c-Myc wurden bereits identifiziert. Eine Auswahl ist in Tabelle 1 dargestellt. Eine erste Zusammenstellung von Interaktionspartnern von c-Myc wurde von Skamuro und Prendergast vorgenommen ⁴⁴. Die bekannteste Interaktion von c-Myc ist die mit seinem Heterodimerisierungspartner Max. Max ist für viele der bekannten c-Myc Funktionen notwendig. Die Dimerisierung am C-terminalen Ende von c-Myc ist eine Voraussetzung für die Erkennung und Bindung an DNA.

Ein weiterer Faktor, der am Carboxyterminus von c-Myc bindet, ist Ini1 (hSNF5). Er ist in Komplexen der Swi/Snf-Familie zu finden. Diese verstärken die Transkription durch ATP-abhängige Chromatin-Remodellierung. Sowohl die bHLH Domäne von c-Myc als auch sein Leuzin-Zipper-Motiv werden für die Interaktion mit Ini1 benötigt. Durch die Interaktion werden Chromatin-Remodellierungs-Enzyme an die Zielpromotoren rekrutiert.

Für die Repression der Transkription von c-Myc Zielgenen interagiert c-Myc mit einer Anzahl von INR-Element-bindenden Proteinen wie Miz-1 ⁴⁵, GTF2I ⁴⁶ und YY1 ⁴⁷. Der Transkriptionsfaktor Miz-1 und seine Interaktion mit c-Myc wird in Absatz 1.4 näher erläutert. Ähnlich wie Miz-1 bindet GTF2I gemeinsam mit c-Myc an INR-Elemente. So verhindert c-Myc die Komplexbildung von GTF2I und TBP und reprimiert auf diese Weise die Transkription ⁴⁶.

Die Bindung mit YY-1 ist einer der wenigen Fälle, in denen die Bindung an Max keine Rolle zu spielen scheint ⁴⁷. YY1 ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der abhängig vom Kontext seiner DNA-Bindung als Repressor, Aktivator oder Initiator der Genexpression dienen kann ⁴⁸. c-Myc kann die Funktionen von YY-1 unterbinden, da es aufgrund identischer Bindungsstellen den Kontakt von YY-1 zu TBP und TFIIB verhindert ⁴⁹. Umgekehrt vermindert YY-1 die Kooperation von c-Myc und Ras bei der Transformation. Dieser Effekt ist abhängig von der direkten Interaktion von YY-1 und c-Myc sowie der Repressorfunktion von YY-1 ⁵⁰.

Ähnlich wie YY1 inhibiert AP2 über unterschiedliche Mechanismen die Transaktivierung durch c-Myc/Max Dimere: Zum einen interagiert AP2 mit dem Carboxyterminus von c-Myc, so dass Max dort nicht mehr binden kann. Zum anderen konkurriert AP2 mit c-Myc um die gleichen DNA-Bindungsstellen ⁵¹.

Einleitung

Tabelle 1. Beschriebene *bona fide* Protein-Protein Interaktionen von c-Myc

<i>Referenz</i>	<i>Protein</i>	<i>Funktion</i>	<i>Referenz</i>	<i>Protein</i>	<i>Funktion</i>
Veldman <i>et al.</i> 2003 ⁵²	E6	Virales Onkoprotein	Kitaura <i>et al.</i> 2000 ⁵³	p21Cip 1	Zellzykluskontrolle
Vervoorts <i>et al.</i> 2003 ⁵⁴	CBP, p300	Transkriptionsfaktor HAT	Cheng <i>et al.</i> 1999 ⁵⁵	Ini1/hS NF5	Swi/Snf Chromatin -Remodellierung
Frank <i>et al.</i> 2003 ⁵⁶	Tip 60	Transkriptionsfaktor HAT	Taira <i>et al.</i> 1998 ⁵⁷	Amy-1	Transkriptionsfaktor
Von der Lehr <i>et al.</i> 2003 ⁵⁸	Skp2	Transkriptionsfaktor Ubiquitin-E3-Ligase	Mori <i>et al.</i> 1998 ⁵⁹	MM-1	Chaperon Refolding
Hennemann <i>et al.</i> 2003 ⁶⁰	KRIM-1	Transkriptionsfaktor	McMahon 1998 ⁶¹	TRRAP	Transkriptionsfaktor
Madge <i>et al.</i> 2003 ⁶²	Yaf2	Transkriptionsfaktor YY1 associated factor 2	Alexandrov 1997 ⁶³	c-RAF	Kinase
Liu <i>et al.</i> 2003 ⁶⁴	STAGA, Gcn5, SPT3	Transkription HAT	Peukert <i>et al.</i> 1997 ⁴⁵	Miz-1	DNA Bindung Transkription
Zhou <i>et al.</i> 2003 ⁶⁵	Brca1	Transkriptionsfaktor	Thorgeirsson <i>et al.</i> 1996 ⁶⁶	TGF- α , HGF	Liganden, Rezeptorbindung Signaltransduktion
Charytinov <i>et al.</i> 2003 ⁶⁷	Hsp90	Chaperon	Bao <i>et al.</i> 1996 ⁶⁸	Nmi	Transkriptionsfaktor
Mahon <i>et al.</i> 2003 ⁶⁹	Bcr	Serin/Threonin Kinase	Alexandrova <i>et al.</i> 1995 ⁷⁰	Tubulin	Cytoskelett
MacPartlin <i>et al.</i> 2003 ⁷¹	Mlh1, Msh2	DNA Reparatur	Gaubatz <i>et al.</i> 1995 ⁵¹	AP2	Transkriptionsfaktor
Auvinen <i>et al.</i> 2003 ⁷²	Rb	Transkriptionsfaktor	Brough <i>et al.</i> 1995 ⁷³	E1A	Virales Onkoprotein
Otsuki <i>et al.</i> 2003 ⁷⁴	Tiam1	Signaltransduktion	Gupta <i>et al.</i> 1994 ⁷⁵	MEK1	MAP Kinase
Sakamuro <i>et al.</i> 1996 ⁷⁶	Bin1	Amphiphysin II Signaltransduktion	Beijersbergen <i>et al.</i> 1994 ⁷⁷	p107	Transkriptionsfaktor
Mu <i>et al.</i> 2002 ⁷⁸	Pag	Peroxiredoxin, Tumorsuppressor	Singh <i>et al.</i> 1994 ⁷⁹	USF	Transkriptionsfaktor
Eberhardy <i>et al.</i> 2002 ⁸⁰	p-TEFb	Transkriptionsfaktor	Maheswaran <i>et al.</i> 1994 ⁸¹	TBP	TATA-Box Bindeprotein Transkription
Taira <i>et al.</i> 1999 ⁸²	CBF-C/ NF-YC	Transkriptionsfaktor	Roy <i>et al.</i> 1993 ⁴⁶	TFII-I	Transkriptionsfaktor
Izumi <i>et al.</i> 2001 ⁸³	NF-Y Komple x	Transkriptionsfaktor	Hateboer <i>et al.</i> 1993 ⁸⁴	TBP Rb	Transkription
Channavajhala <i>et al.</i> 2002 ⁸⁵	CK2	Serin/Threonin Kinase	Blackwood <i>et al.</i> 1993 ⁴²	Max	Heterodimerisierung Transkription

Fortsetzung Tabelle 1. Beschriebene *bona fide* Protein-Protein Interaktionen von c-Myc

Referenz	Protein	Funktion,	Referenz	Protein	Funktion
Uramoto <i>et al.</i> 2002 ⁸⁶	p73	Transkriptionsfaktor	Wang <i>et al.</i> 2007 ⁸⁷	HPV-E7	Viraler Transkriptionsfaktor
Guo <i>et al.</i> 1998 ⁸⁸	PAM	Transkriptionsfaktor	Shrivastava <i>et al.</i> 1993 ⁴⁷	YY-1	Transkriptionsfaktor
Seoane <i>et al.</i> 2001 ⁸⁹	Smad3, Smad4	Transkriptionsfaktor DNA Bindung	Brenner <i>et al.</i> 2005 ⁹⁰	Dnmt3a	DNA Methyltransferase, Transkription
Gartel <i>et al.</i> 2001 ⁹¹	Sp1, Sp3	Transkriptionsfaktor DNA Bindung	Koshiji <i>et al.</i> 2004 ⁹²	Hif1- Alpha	Transkription
Takayama <i>et al.</i> 2000 ⁹³	ORC1	Transkriptionsfaktor DNA Bindung	Satou <i>et al.</i> 2001 ⁹⁴	Tif-1, Hdac1; mSIN3	Transkription, HDAC
Takayama <i>et al.</i> 2000 ⁹⁵	Cdc6	Zellzykluskontrolle DNA Bindung, Signaltransduktion	Park <i>et al.</i> 2002 ⁹⁶	Baf53, Actin like 6a	Chromatin- Remodellierung
Chapman <i>et al.</i> 2002 ⁹⁷	NF κB 3	Transkriptionsfaktor	Tinel <i>et al.</i> 2003 ⁹⁸	CEBPαβ	Transkriptionsfaktor
Yu <i>et al.</i> 2005 ⁹⁹	PARP-10	ADP-Ribosyl- Transferase	Cairo <i>et al.</i> 2005 ¹⁰⁰	PML	Transkriptionsfaktor
Grandori <i>et al.</i> 2005 ¹⁰¹	Poll SL1	Polymerase I Transkription	Noguchi <i>et al.</i> 1999 ¹⁰²	Jnk1	Kinase
Cheng <i>et al.</i> 2006 ¹⁰³	ER alpha	Transkriptionsfaktor	Feng <i>et al.</i> 2002 ¹⁰⁴	Smad2, Smad 3	DNA Bindung, Transkriptionsfaktor
Seth <i>et al.</i> 1991 ¹⁰⁵	Cdc2	Zellzykluskontrolle	English <i>et al.</i> 1998 ¹⁰⁶	Erk5	Kinase
Alvarez <i>et al.</i> 1991 ¹⁰⁷	E74 like factor 3	Virales Protein	Fukunaga <i>et al.</i> 1997 ¹⁰⁸	Erk1	Kinase
Smith <i>et al.</i> 2002 ¹⁰⁹	Gsk3β	Kinase	Wei <i>et al.</i> 2005 ¹¹⁰	Fbw7	Ubiquitin-Ligase
McEwan <i>et al.</i> 1996 ¹¹¹	TFII B	Transkriptionsfaktor	Qi <i>et al.</i> 2004 ¹¹²	p19Arf	Zellzykluskontrolle

Die Interaktion von c-Myc mit dem Tumorsuppressor Brca1 interferiert mit der Transaktivierung des *cdc25A* Promotors und kann die Kotransformation von c-Myc und Ras inhibieren ¹¹³. Außerdem wurde ein ternärer Komplex von c-Myc, Brca1 und NMI postuliert, der die Transaktivierung des *hTERT* Promotors durch c-Myc inhibiert. Komplexe mit nur zwei dieser Komponenten zeigen den Effekt nicht ^{68, 114, 115}.

Die bisher angesprochenen Bindungen haben ihre Binderegion am C-Terminus von c-Myc. Die Mehrzahl der am N-Terminus bindenden Proteine spielt eine Rolle in

der Regulation der c-Myc Zielgene durch direkte Änderung der Transkriptionsaktivität oder durch Modifikation der Chromatinstruktur.

Bei der Aktivierung von c-Myc Zielgenen und bei seiner Funktion als Onkoprotein spielt TRRAP eine Hauptrolle. TRRAP hat 434 AS und Ähnlichkeit mit der Familie der ATM/PI3 Kinasen ^{61, 116}. TRRAP bindet MB I und MB II. c-Myc rekrutiert TRRAP zu den Promotoren seiner Zielgene. Tip48 und Tip49 sind ATP-Helikasen, die als Bestandteile von TRRAP-Komplexen identifiziert wurden. Beide Proteine binden c-Myc an MB II ¹¹⁷.

Ebenfalls an MB II bindet Baf53A. Baf53A ist Bestandteil von nukleären Swi/Snf-Komplexen und notwendig für die onkogene Aktivität von c-Myc ⁹⁶. Wahrscheinlich rekrutiert Baf53A in Interaktion mit Tip48 und Tip49 im Tip60-Komplex Histonacetylaseaktivität (HAT) zu Chromatin-Remodellierungs-Komplexen, die mit c-Myc assoziiert sind ⁹⁶.

Die Proteine p300 und CBP sind Histonacetylasen und interagieren mit c-Myc und vielen weiteren Transkriptionsfaktoren. Sie dienen als Koaktivatoren der Genexpression ⁵⁴. Die Kotransfektion von CBP stimuliert die c-Myc Transaktivierung und CBP wird in vivo zu c-Myc Zielgenen rekrutiert. Es ist noch unklar, an welcher Stelle genau p300 und CBP an c-Myc binden. Bekannt ist, dass c-Myc selbst ein Substrat für die Acetylierung durch p300^{54, 118} sowie für andere TRRAP-assoziierte Acetylasen (etwa hGCN5 und Tip60) ¹¹⁹ ist. Die Koaktivatoren p300 und CBP verstärken durch ihre Bindung die Aktivierung von E-Box Promotoren durch c-Myc. Kürzlich wurde gezeigt, dass SNIP-1 (Smad interacting Protein-1) c-Myc bindet und dadurch die Interaktion von p300/CBP und c-Myc verstärkt. SNIP1 bindet mit seinem Carboxyterminus an den Aminoterminus von c-Myc und stabilisiert es damit gegen den proteasomalen Abbau. Beide Proteine kooperieren bei der Transformation von MEF Zellen und führen zur Koloniebildung von Rat-1 Zellen ¹²⁰.

Neben den Chromatin-Remodellierungs-Aktivitäten interagiert c-Myc auch direkt mit RNA Polymerase II über TBP und p-TEFb-Komplexe. TBP ist eine Schlüsselkomponente des TFIID Transkriptionsfaktors ^{81, 84}. Der p-TEFb Komplex und insbesondere seine Komponenten CyclinT1 und Cdk8 binden an den N-Terminus von c-Myc. Der Cyclin T1-Cdk9 Komplex vermittelt den letzten Schritt bei der Aktivierung des *cad* Promotors. Mechanistisch hängt diese Funktion von der Aktivierung der Elongation der Transkription nach Phosphorylierung von PolIII durch Cdk9 ab ⁸⁰.

Die Induktion der rRNA Transkription ist abhängig von MB II. Die Promotorbindung geht mit der Rekrutierung von TRRAP, PolII Transkriptionsfaktoren und verstärkter Histonacetylierung einher¹²¹. TBP (TATA binding Protein) ist auch ein N-terminal bindendes Protein⁸⁴. Obwohl die bereits früh entdeckte Interaktion als schwach bezeichnet wurde, konnte sie kürzlich im Zusammenhang mit der Transkription durch Polymerase I, die u.a. für die Transkription von rRNA Genen zuständig ist, bestätigt werden. Hier konnte gezeigt werden, dass c-Myc mit dem PolII spezifischen Faktor SL-1 assoziiert ist. SL-1 stellt einen Komplex aus TBP und drei PolII spezifischen TBP-assozierten Faktoren, TAF₁₁₀, TAF₆₃ und TAF₄₈, dar¹⁰¹.

Zwei weitere Proteine, Skp2 und p19Arf, binden sowohl an Regionen des N-Terminus als auch des C-Terminus von c-Myc¹²²⁻¹²⁴. Diese Interaktionen machen die Kontrolle der c-Myc Aktivität über die Proteininstabilität durch posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise Phosphorylierungen und Ubiquitinierungen, deutlich. Das c-Myc Protein hat mit 15-20 Minuten eine sehr kurze Halbwertszeit¹²⁵. Die Ubiquitinierung von c-Myc und damit seine Halbwertszeit könnte durch den Ras Signalweg und durch dessen Mutationen, wie sie z. B. im Burkitt-Lymphom gefunden wurden, verändert sein^{126, 127}. Es ist bekannt, dass die Aktivität einiger Transkriptionsfaktoren von ihrem Ubiquitinierungsstatus abhängt^{128, 129}. Das gilt auch für c-Myc. Der Bereich, der für den Abbau von c-Myc verantwortlich ist, das sogenannte Degron, ist in der Transaktivierungsdomäne von c-Myc lokalisiert. Eine Verstärkung der c-Myc Ubiquitinierung ist mit einer Verkürzung der c-Myc Halbwertszeit korreliert. Eine Ubiquitinierung kann allerdings auch zur Verstärkung der Transkriptionsaktivität von c-Myc führen^{129, 130}.

Eine Verbindung zwischen der Ubiquitinierung und der c-Myc Aktivität konnte mit der E3 Ubiquitin-Ligase Skp2 nachgewiesen werden, die c-Myc an MB II bindet und dessen Abbau reguliert. Skp2 wird aber auch von c-Myc an Zielgenpromotoren rekrutiert und kann dort die Transkription durch c-Myc aktivieren^{58, 122} (s. 1.2.1).

Eine weitere Ubiquitin-Ligase, Hect (homologous to E6-AP carboxy-terminus) H9, verstärkt ebenfalls die c-Myc Transaktivierung. HectH9 bindet c-Myc und Miz-1 und ubiquitiniert verschiedene Aminosäuren des c-Myc *in vivo*. Miz-1 kann die Ubiquitinierung von c-Myc durch HectH9 inhibieren. Eine c-Myc Mutante mit 6 ausgetauschten zentralen Lysinen (MycKR6) ist weniger ubiquitiniert. Diese Mutante aktiviert einige c-Myc Zielgene in Fibroblasten weniger stark als der Wildtyp, wahrscheinlich durch eine Störung der Rekrutierung der HAT Aktivität von p300¹³¹.

HectH9 bindet auch an p19Arf und reguliert darüber die Funktion des Tumorsuppressors p53¹³². p19Arf wiederum wird sowohl vom N-Terminus als auch von der bHLH/LZ Domäne von c-Myc gebunden. Diese Bindung bewirkt die Relokalisation von c-Myc vom Nukleolus in den Nukleus. In Mäusen und Ratten wird die Transaktivierung und die Transformationswirkung von c-Myc durch die Interaktion mit p19Arf gestört, wobei die Repressor- und die Apoptose-Funktion von c-Myc unbeeinflusst bleiben. Hierdurch könnte die wachstumshemmende Funktion von p19Arf, die unabhängig von der Aktivierung des Mdm2-p53-Signalwegs beobachtet wurde, erklärt werden^{112, 124}. Kürzlich konnte die Interaktion von c-Myc und p14Arf, dem humanen Homologen von p19Arf, bestätigt werden¹³³.

Neben der vorliegenden Auswahl an wichtigen Interaktionspartnern von c-Myc sind viele weitere Interaktionen beschrieben worden (Tabelle 1). Deutlich ist, dass c-Myc seine Funktionen mit Hilfe von Protein-Protein Interaktionen ausführt.

1.4 Der Miz-1 Transkriptionsfaktor

Miz-1 (*Myc interacting zinc finger protein 1*) wurde als Interaktionspartner von c-Myc mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems identifiziert¹³⁴. Miz-1 besitzt eine hydrophobe, etwa 120 Aminosäuren umfassende BTB/POZ (*Broad Complex, tramtrack, Brick a Brac / Pox virus and Zinc finger*) Domäne. BTB/POZ Domänen dienen als Interaktionsregionen mit anderen Proteinen und vermitteln außerdem die Bildung von Homodimeren^{135, 136}. Strukturuntersuchungen an der POZ Domäne von Miz-1 ergaben, dass sich diese als Tetradimere zusammenlagern können. Dies geschieht über zwei unterschiedliche Schnittstellen: einer alpha Helix (auch aus anderen Proteinen mit POZ Domäne bekannt) zur Bildung von Homodimeren und einer Beta-Faltblattstruktur, die eine Assoziation von zwei POZ Domänen Dimeren zum Tetramer vermittelt¹³⁷. Häufig dokumentierte Assoziationspartner solcher Domänen sind transkriptionelle Korepressoren wie N-CoR, Smrt oder Sin3. Miz-1 bindet mit einer alpha-helikalen Struktur („Spacer“ Region), die zwischen dem 12. und dem letzten seiner 13 Zinkfinger vom Cys-2-His-2 Typ lokalisiert ist, an c-Myc¹³⁴. Die ersten 12 Zinkfinger sind in „tandem repeats“ seriell angeordnet. Ein weiteres Zinkfinger-Motiv liegt mit 79AS Abstand näher am Carboxyterminus. Miz-1 ist ein in Huhn, Maus und Mensch konserviertes Protein.

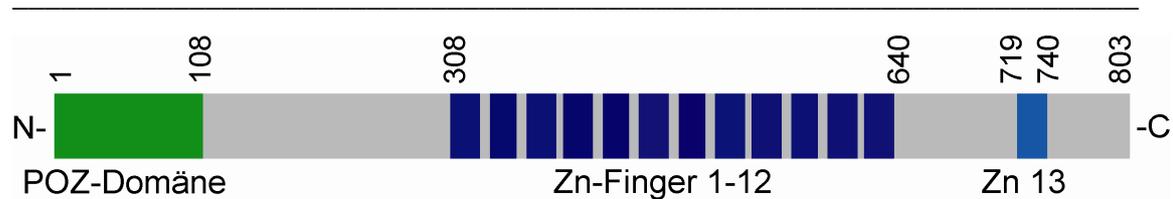


Abbildung 2. Sequenzelemente des Miz-1 (Myc interacting zinc finger 1) Proteins. Die ersten 108 Aminosäuren am aminoterminalen Ende bilden die BTB/POZ-Domäne (bric-a-brac/pox virus and zinc finger). Die blauen Balken markieren die Position der Zinkfinger 1-13 (Zn: Zinkfinger).

Viele Proteine mit POZ Domäne bilden im Zellkern schwerlösliche Aggregate¹³⁵. Miz-1 allerdings ist ein überwiegend cytoplasmatisches, lösliches Protein. Die Lokalisation in den Zellkern wird u.a. durch c-Myc vermittelt, da Miz-1 selbst keine Kernlokalisierungssequenz aufweist. Nach der Kernlokalisierung tritt Miz-1 zusammen mit c-Myc in nukleären Aggregaten auf, die experimentell nur unter hohen Salzkonzentrationen löslich, extrahierbar und nachzuweisen sind.

Bereits 1997 konnte die Bindung von Miz-1 an Mikrotubuli im Cytoplasma gezeigt werden. Colchizin bewirkt eine Störung dieser Assoziation und nachfolgend eine gesteigerte Kernlokalisation von Miz-1⁴⁵. Das *miz-1* Gen befindet sich auf Chromosom 1 in der Region 1p36.1 bis 1p36.2¹³⁸. Die Deletion dieser Region ist mit der Entstehung von Neuroblastom-Tumoren korreliert^{139, 140}. *miz-1* ist häufig in Neuroblastomen, welche einen günstigen Verlauf aufweisen, überexprimiert. Außerdem könnte Miz-1 direkt oder indirekt weitere Gene, die mit einem günstigen Krankheitsverlauf korreliert sind, regulieren¹⁴¹.

Eine Deletion des *miz-1* Genlokus in der Maus führt zu einer frühen Letalität um Tag 7.5 in der Embryonalentwicklung, was auf eine essentielle Funktion schließen lässt. *miz-1* +/- Mäuse bleiben während der ersten 24 Lebensmonate unauffällig, während *miz-1* -/- Embryonen offensichtlich langsamer proliferieren und um Tag 7.5 eine gesteigerte Apoptoserate aufweisen. Die Expression des Zellzyklusinhibitors p57Kip2 ist im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen erniedrigt. Miz-1 reprimiert in Abhängigkeit von c-Myc die Expression der p57Kip2 Expression. Beide Proteine konnten *in vivo* an der „core“ Promotor Region des p57Kip2 Gens nachgewiesen werden¹⁴².

1.5 Interaktionspartner von Miz-1

Die bekannteste Interaktion von Miz-1, die Interaktion mit c-Myc, wurde mit einem Hefe-Zwei-Hybrid-System entdeckt (zur Funktion s. 1.6.2).

In einem Hefe-Zwei-Hybrid-System, in dem die POZ-Domäne von Miz-1 als Binderegion diente, wurde TopBP1 (Topoisomerase II binding protein 1) als ein wichtiger Interaktionspartner von Miz-1 identifiziert¹⁴³. Die Interaktion führt zu einer Stabilisierung von TopBP1 durch Miz-1. TopBP1 besitzt acht BRCT-(Brca1 carboxyterminal) Domänen. Diese Proteinmotive wurden zuerst im Brca1-Protein identifiziert¹⁴⁴. In der 6. BRCT-Domäne von TopBP1 befindet sich eine homologe DNA-Sequenz zur Poly(ADP)-Ribose Bindesequenz der Poly(ADP)-Ribose-Polymerase (PARP). Kürzlich wurde auch PARP-1 als Interaktionspartner von TopBP1 nachgewiesen¹⁴⁵. Nach DNA-Schädigung bindet PARP spezifisch an den DNA-Strangbruch, wodurch die Synthese von ADP-Ribose ausgelöst wird¹⁴⁶.

Eine weitere Interaktion von Miz-1 ist für die Kontrolle des Zellzyklusarrests nach DNA Schädigung durch Miz-1¹⁴⁷ wichtig. Das Protein 14-3-3 η inhibiert die Miz-1 Funktion, in dem es die Miz-1 Bindung an DNA reguliert. Dabei bindet 14-3-3 η an Miz-1, allerdings erst nach Phosphorylierung von Miz-1 durch die Kinase Akt. Diese Phosphorylierung reguliert die zelluläre Antwort auf DNA-Schädigung, während Zellen in Miz-1 Mutanten, die nicht mehr phosphoryliert werden können, im G1 Arrest verbleiben.

Auch Hcf-1 (Human host cell factor-1) wurde als Interaktionspartner von Miz-1 identifiziert¹⁴⁸. Hcf-1 ist ein notwendiger Faktor für die Zellzyklusprogression und die Induktion viraler „immediate-early“ Gene. Hcf-1 interagiert mit zwei unterschiedlichen Regionen von Miz-1, der POZ Domäne, und einer carboxyterminalen Domäne, die auch mit p300 interagiert. Hcf-1 reprimiert die Miz-1 vermittelte Transaktivierung von *p15Ink4B* durch die Störung der p300 Rekrutierung.

ECRG-1 (Esophageal cancer-related gene 1) wurde ebenfalls mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System und außerdem mit der Koimmunopräzipitation als Miz-1 Interaktionspartner identifiziert¹⁴⁹. ECRG-1 ist ein möglicher Tumorsuppressor, dessen Überexpression das Zellwachstum inhibieren und *p15Ink4B* und den G1 Zellzyklusarrest durch die Interaktion mit Miz-1 induzieren kann.

Kürzlich wurde Bcl-6 als weiterer Interaktionspartner von Miz-1 verifiziert. Bcl-6 ist ein kernlokalisierendes BTB/POZ Protein der Zink-Finger-Familie und beteiligt an der Entstehung von B-Zell-Non-Hodgkin Lymphomen. Bcl-6 fungiert als transkriptioneller Repressor, der in der Lage ist, an DNA zu binden und verschiedene Korepressoren (N-CoR, Smrt, Sin3a und Mta3) an Promotoren zu rekrutieren¹⁵⁰.

Die Interaktion von Transposase Sleeping Beauty (SB) mit Miz-1¹⁵¹ reduziert die Expression von Cyclin D1 durch SB, was in einer verlängerten G1 resultiert.

1.6 Die Regulation der Transkription durch c-Myc

c-Myc ist ein Mitglied einer Gruppe von Proteinen, die als c-Myc/Max Netzwerk bezeichnet werden. Obwohl klar ist, dass c-Myc/Max Dimere an Konsensus E-Boxen binden, ist der direkte Nachweis der Proteine an den Bindestellen schwierig, da primär andere Komplexe an diese DNA-Sequenzen binden. Ein weiteres wichtiges Heterodimer ist Mnt/Max (Übersicht in Baudino & Cleveland, 2001¹⁵²). In ChIP Experimenten konnte Mnt/Max an c-Myc Zielpromotoren nachgewiesen werden, vornehmlich dann, wenn c-Myc supprimiert war^{153, 154}. Das zeigt, dass c-Myc/Max Heterodimere in ständiger Konkurrenz mit Mnt/Max Heterodimeren um die Bindung an diese Promotoren und damit deren Regulationen stehen¹⁵³. Im Gegensatz zu c-Myc/Max rekrutieren Mnt/Max Komplexe Sin3/HDAC Repressoren, um Gene primär zu reprimieren¹⁵⁵. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen, führt die Ausschaltung von Mnt zu hyperproliferativen Zellen und zum verfrühten Eintritt in die S-Phase verglichen mit *mnt +/+* MEFs^{156, 157}.

Mitglieder des c-Myc/Max Netzwerkes können Zielgene aktivieren und reprimieren. Dies gilt insbesondere für c-Myc, bei dem die Mechanismen der transkriptionellen Regulation intensiv untersucht worden sind.

1.6.1 Transkriptionelle Aktivierung durch c-Myc

In den letzten Jahren konnten verschiedene Aspekte des Aktivierungsmechanismus aufgeklärt werden (Übersicht siehe z. B. Adhikary & Eilers² und Cowling & Cole¹⁵⁸).

c-Myc aktiviert die Transkription durch Bindung an kernlokalisierte Kofaktoren, die zu den Promotoren der Zielgene rekrutiert werden. Die Promotoren binden c-Myc über so genannte E-Boxen mit der Konsensussequenz (CACAA/GTG, E-Box).

Als Kofaktoren spielen in diesem Zusammenhang nukleosomen-modifizierende Komplexe eine wichtige Rolle. c-Myc bindet mit der MB II Domäne direkt an TRRAP (TRansactivation/tRansformation Associated Protein)⁶¹, einem essentiellen Kofaktor der Transformation durch c-Myc. TRRAP ist eine Untereinheit der Tip60 und Gcn5 Histonacetylasekomplexe (HAT) und weist eine Homologie zur PI3K/ATM Familie auf, besitzt aber selbst keine funktionale Kinaseaktivität. c-Myc bindet direkt an eine

interne Domäne von TRRAP¹⁵⁹. Transformationshemmende Deletionen in den c-Myc Domänen MB I und MB II sind in der Stärke der TRRAP Assoziation vermindert^{61, 160}.

Einen Hinweis auf den Aktivierungsmechanismus durch diese Interaktion gibt die Funktion von TRRAP als Komponente des SAGA Komplexes (Spt/Ada/Gcn5/Acetyltransferase)¹⁶¹. SAGA besteht aus etwa 20 Proteinen und ist an der Regulation der Transkription in Hefezellen beteiligt. Viele Komponenten, auch TRRAP, sind konserviert^{162, 163}. Die Funktionen vieler SAGA Proteine sind noch unbekannt. Eine Untereinheit mit nachweisbarer enzymatischer Aktivität ist die Histonacetyltransferase Gcn5. Im Allgemeinen ist die Histonacetylierung mit der transkriptionellen Aktivierung assoziiert¹⁶⁴. c-Myc ist in der Lage HAT Aktivität zu rekrutieren⁶⁴ und TRRAP wird in Folge von Serumstimulation zu den Promotoren von c-Myc Zielgenen rekrutiert¹⁶⁵. c-Myc Zielgene weisen nach Aktivierung durch c-Myc eine erhöhte Histonacetylierung auf^{160, 166}. Im Gegensatz dazu ist die Repression vieler c-Myc Zielgene mit Deacetylierungen verbunden¹⁶⁷. Heute geht man davon aus, dass ein Mechanismus der Genaktivierung durch c-Myc in der Rekrutierung von Komplexen liegt, die TRRAP enthalten und die Acetylierung von Promotoren bewirken.

Mittlerweile ist TRRAP als Untereinheit verschiedener Komplexe dokumentiert¹⁵⁸. Beispielsweise ist TRRAP Bestandteil des p400-E1A Komplexes, der ebenfalls mit c-Myc interagiert. Dieser Komplex besitzt jedoch keine eigene HAT Aktivität: c-Myc scheint daher nicht nur HAT Aktivität zu Promotoren zu rekrutieren, sondern noch weitere Funktionen zu erfüllen¹⁶⁸.

c-Myc bindet einen weiteren Komplex, der ebenfalls TRRAP enthält, den Tip60 Histonacetylasekomplex. Der Tip60 Komplex enthält Tip49 (RUVBL1) und Tip48 (RUVBL2), die beide ATPase Domänen besitzen¹¹⁷. Tip60 zeigt eine hohe Übereinstimmung mit dem oben genannten Komplex, welcher die Swi/Snf verwandte Untereinheit p400 enthält¹⁶⁸.

Weitere Hinweise auf eine enge Kooperation zwischen den Tip48 und Tip49 ATPasen und c-Myc wurden in *Drosophila* gefunden. Das *Drosophila* Homolog von Tip48 - Pontin - interagiert mit dMyc und verstärkt den „loss-of-function“ Phänotyp von d-Myc während der Entwicklung¹⁶⁹. Ebenso sind die *Xenopus* Homologen von Tip48 (Pontin) und Tip49 (Reptin) positive Kofaktoren in der Zellproliferation.

Allerdings wurde bei ihnen auch die Beteiligung von c-Myc/Miz-1 Komplexen an der Repression beschrieben ¹⁷⁰.

Obwohl TRRAP ein essentieller Kofaktor der c-Myc abhängigen Genaktivierung zu sein scheint, werden zahlreiche c-Myc Zielgene unabhängig von TRRAP induziert und können sogar unabhängig von einer verstärkten Histonacetylierung aktiviert werden ¹⁷¹. Der Nachweis der TRRAP und/oder HAT unabhängigen Aktivierung gelang durch die Verwendung von c-MycΔMB II Mutanten. Die Deletion von MB II hemmt die Bindung von c-Myc an TRRAP und reduziert die Expression der meisten c-Myc Zielgene deutlich, dennoch können einige Zielgene durch MB I aktiviert werden ^{38, 160}.

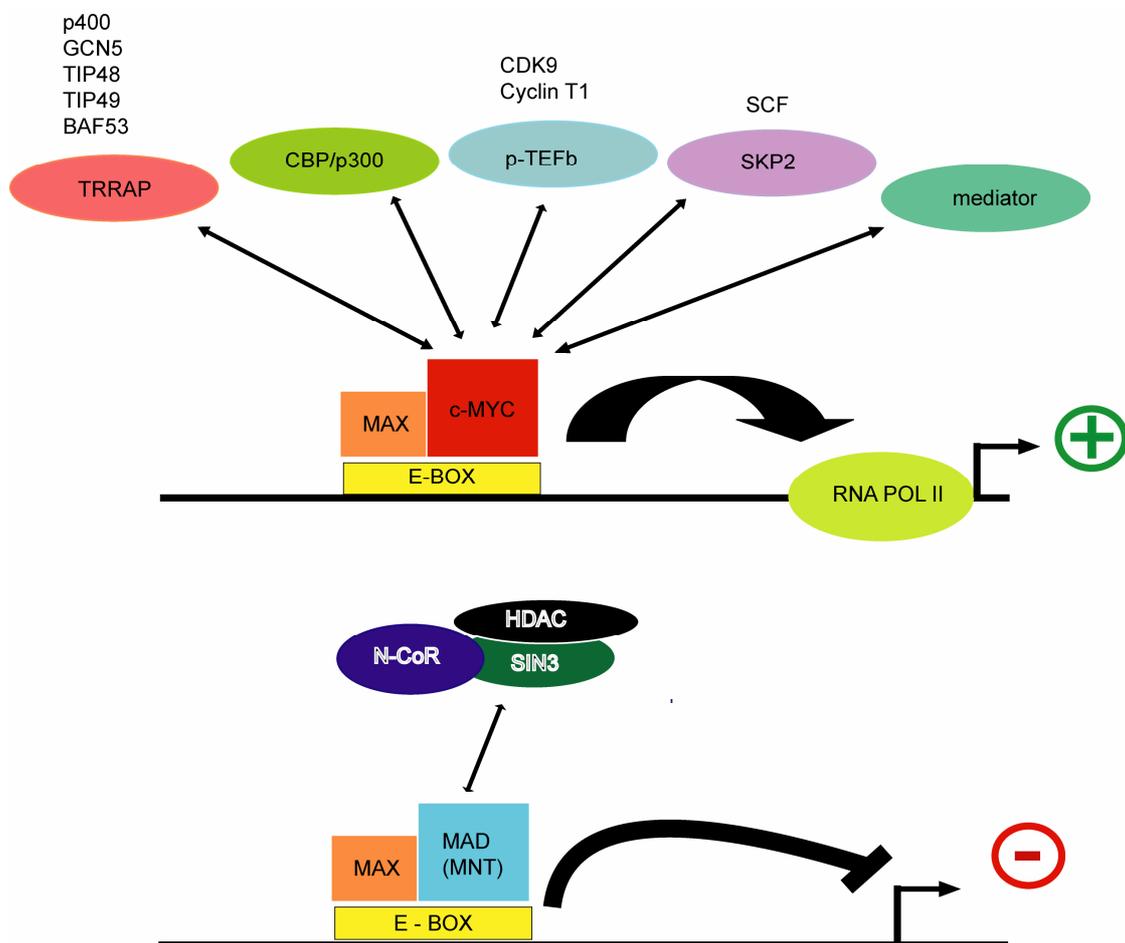


Abbildung 3. Regulierung von E-Box Promotoren. Oben: c-Myc/Max Heterodimere aktivieren Promotoren durch Rekrutierung verschiedener Transkriptionsaktivator-Komplexe. Unten: Repression von E-Box Promotoren durch Mad/Max Heterodimere, als Antagonisten von c-Myc/Max über Rekrutierung von Repressorkomplexen (modif. nach Adhikary & Eilers ²).

Die Untersuchung der HAT unabhängigen Aktivierung von c-Myc Zielgenen zeigte, dass manche Promotoren zwar mit RNA Polymerase II (PolII) besetzt sind, dass

aber das Fortschreiten der Transkription in der Abwesenheit von c-Myc blockiert ist ¹⁷². PolIII kann am 3' Ende des *cad* Gens nur dann nachgewiesen werden, wenn c-Myc ebenfalls gebunden und die Transkription aktiv ist. Im Fall von *cad* geht die Bindung von c-Myc an den Promotor der Freigabe („clearance“) der PolIII voraus. Die Stimulation der PolIII Promotor „clearance“ ist verbunden mit der Aktivität der PolII Kinasen TFIIH und p-TEFb (positive transcription elongation factor b) ¹⁷³.

In GST „pull-down“ Experimenten konnte die Bindung von GST-c-Myc an beide Untereinheiten von p-TEFb, Cyclin T1 und Cdk9, nachgewiesen werden ⁸⁰. In einer weiteren Studie wurde die Rekrutierung von *mediator*, TFII-H und p-TEFb zum Cyclin D2 Promotor durch c-Myc nachgewiesen. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass c-Myc die RNA PolIII „clearance“ durch die Rekrutierung von RNA-PolIII-CTD (carboxyterminale Domäne)-Kinasen unterstützt ⁸⁰.

c-Myc ist nicht nur an der Transkription von RNA PolIII Zielgenen beteiligt, sondern auch an der von RNA PolI und RNA PolII. c-Myc konnte an den Promotoren einiger dieser Zielgene nachgewiesen werden ^{101, 174-177}. PolI transkribiert Gene für ribosomale RNA, PolII für ribosomale 5S RNA und tRNAs. Auch viele andere c-Myc Zielgene sind an der Synthese von Ribosomen und an der Proteinbiosynthese beteiligt ^{178, 179}. Diese Vorgänge spielen eine wichtige Rolle für das Zellwachstum. Für den Aufbau der Ribosomen ist rRNA notwendig. c-Myc stimuliert die rRNA Transkription sowohl in *Drosophila* als auch in Säugern ^{101, 121, 174}.

Für die Proteinbiosynthese sind weiterhin tRNAs und 5S RNA notwendig, die von der RNA PolIII transkribiert werden. Die Überexpression von c-Myc führt zu einer raschen Induzierung der PolIII Aktivität und zur Bindung von c-Myc an PolIII Zielgene. Der genaue Mechanismus der Aktivierung durch c-Myc ist noch unklar. „Pull-down“ Versuche haben eine Bindung eines PolIII Kofaktors (TFIIIB) gezeigt ¹⁷⁶.

1.6.2 Mechanismen der Reprimierung durch c-Myc

Neben der Genaktivierung bewirkt c-Myc auch die Repression spezifischer Gene. Repressionsmechanismen sind weit weniger gut untersucht als Aktivierungsmechanismen, obwohl die Transformation von Zellen durch c-Myc auch von der Genrepression abhängig ist ¹⁸⁰. Zudem trägt die transkriptionelle Repression durch c-Myc direkt zum Phänotyp von Zellen bei, die durch c-Myc-transformiert wurden ^{181, 182}. c-Myc reprimiert beispielsweise die Expression von h-Ferritin. Dessen Überexpression führt zu einer Hemmung der Transformation ¹⁸³.

Zielgene der Repression wurden durch verschiedene Ansätze, wie induzierbare *c-myc* Allele¹⁸⁴, *c-myc* „knock out“ Zellen¹⁸⁵ oder durch den Vergleich von „Microarray“-Daten aus unterschiedlichen *c-Myc* exprimierenden oder nicht exprimierenden Tumorgeweben, identifiziert¹⁸⁶.

Eine wichtige Zielengruppe sind die Inhibitoren der Zellproliferation. Hierzu gehören die Zellzyklusinhibitoren *p21Cip1*^{21, 187-191}, *p27Kip1*¹⁹², *p15Ink4B*^{89, 193}, *p18Ink4c*¹⁹⁴ und *p57Kip2*¹⁹⁵ (s. 1.7.1). *c-Myc* inhibiert auch die Reifung von Präadipozyten zu Adipozyten. Dieser Prozess wird durch *c/EBP-α* gesteuert¹⁹⁶. *c-Myc* inhibiert *c/EBP-α* über dessen „core“ Promotor¹⁹⁷.

Während die Genaktivierung an E-Boxen oder ähnlichen DNA-Sequenzen stattfindet, wurde bisher keine einheitliche DNA-Region für die Repression identifiziert. Für den Adenovirus Major Late Promotor (AdML), den *p15Ink4B* und den *p21Cip1* Promotor konnte die „core“-Promotor-Region, speziell das INR Element, als die entscheidende Sequenz für die Repression verifiziert werden.

Auch andere DNA-Sequenzen für eine *c-Myc* abhängige Repression wurden gefunden. So erfolgt die Repression von PDGF (platelet-derived growth factor) über NF-Y Bindestellen und die Interaktion von *c-Myc* und NF-Y⁸³. *c-Myc* reprimiert ebenfalls die Expression von *Gadd45*¹⁸¹, einem Gen, das bei DNA-Schädigung induziert wird. Untersuchungen zeigten, dass eine proximale kurze GC-reiche Region innerhalb des *Gadd45* Promotors für die Repression verantwortlich ist. Diese Region enthält Bindemotive für den Transkriptionsfaktor Sp1, so dass *c-Myc* möglicherweise durch direkte Interaktion mit SP1/SP3 zur Hemmung der Expression von *Gadd45* führt¹⁹⁸.

Initiator Elemente (INR) sind definiert als DNA-Sequenzen, die unabhängig von der Anwesenheit eines TATA (*tumor associated transplantation element antigen*) Elements den Startpunkt der Transkription festlegen können. Am *p15Ink4B* Promotor unterdrückt *c-Myc* die Aktivierung des Promotors durch freies Miz-1. Miz-1 aktiviert den Promotor durch die Rekrutierung von p300 Histonacetylase-Aktivität. Das *c-Myc/Max* Heterodimer bindet an Miz-1 am „core“ Promotor und reprimiert dessen Aktivierung durch Miz-1¹⁹³.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die DNA Methyltransferase Dnmt3a an Miz-1 Ziel promotoren, die durch *c-Myc* reprimiert werden, bindet. Es ist bekannt, dass Dnmt3a HDACs rekrutiert, was wiederum zur Repression führen kann⁹⁰.

MB II spielt in der Repression durch die Bindung von Tip48 und Tip49 sowie p400 eine mögliche Rolle. Tip48/49 sind an der c-Myc abhängigen Repression beteiligt und p400 kann den *p21Cip1* Promotor reprimieren¹⁹⁹.

c-Myc hemmt die Expression von p15Ink4B auch in von INR unabhängiger Art und Weise. c-Myc interagiert mit aktiviertem Smad2 und Smad3 und formt auf dem *p15Ink4B* Promotor einen inaktiven SP1-Smad-c-Myc Komplex, der möglicherweise andere Korepressoren rekrutiert oder SP1 durch Konformationsänderungen zu einem Repressor macht²⁰⁰.

Der *p21Cip1* Promotor wird von c-Myc als Antwort auf bestimmte Stimuli, TGF β oder UV-Bestrahlung und als Antwort auf die Induktion der Zelldifferenzierung reprimiert. TGF β setzt Miz-1 aus dem reprimierenden Miz-1/c-Myc/Max Komplex frei, in dem es die Expression von c-Myc supprimiert. Miz-1 kann dann die Expression von *p15Ink4B* aktivieren. Miz-1 kooperiert mit Smad3 und Smad 4, die an einer Smad Erkennungssequenz oberhalb des „core“ Promotors binden.

c-Myc hat offensichtlich die Möglichkeit, durch verschiedene Mechanismen und Kooperationen viele Zielgene zu regulieren. Es ist daher nicht erstaunlich, dass c-Myc an vielen unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt ist.

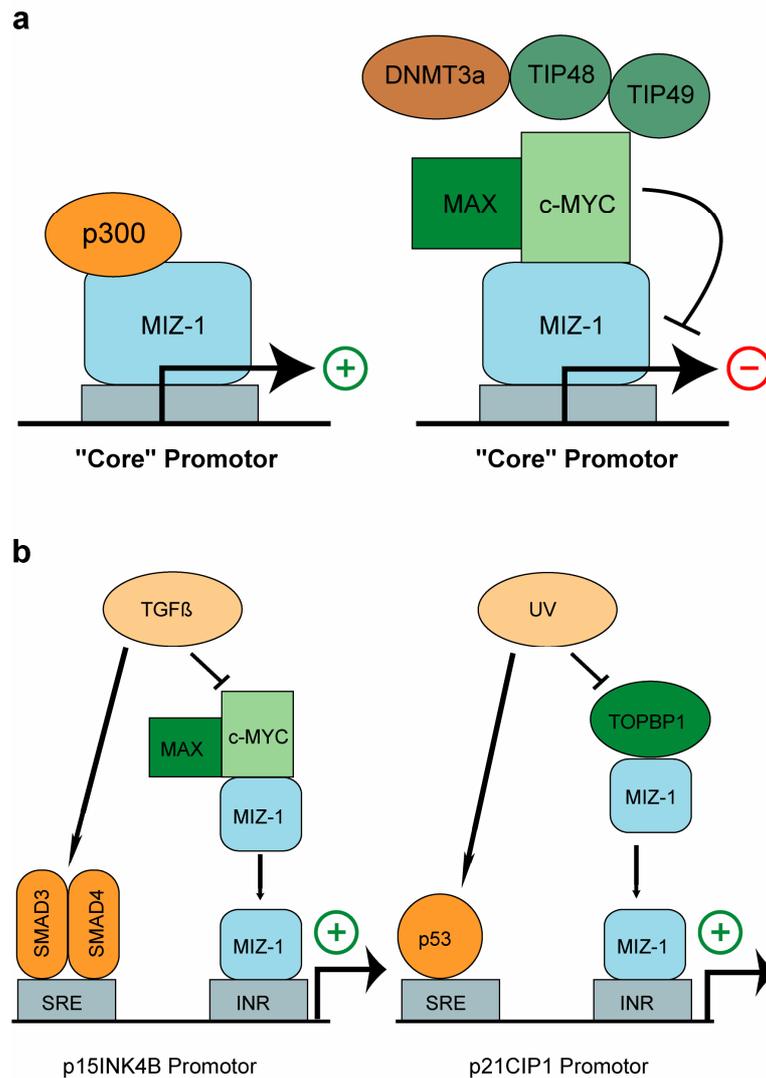


Abbildung 4. Repression durch c-Myc über die Interaktion mit Miz-1. A) Miz-1 kann „core“ Promotoren durch die Rekrutierung von p300 aktivieren. Durch Bindung des c-Myc/Max Heterodimers an Miz-1 und die Rekrutierung von Dnmt3a und Tip48/49 wird die Transkription reprimiert. B) Rolle von Miz-1 in der zellulären Antwort auf TGFβ und UV-Strahlung. TGFβ hemmt die Bildung des reprimierenden c-Myc/Miz-1 Komplexes, so dass Miz-1 an das INR Element des *p15Ink4B* Promotors binden kann und die Transkription aktiviert. Gleiches erfolgt bei der Freisetzung von Miz-1 aus einem hemmenden TopBP1/Miz-1 Komplex am *p21Cip1* Promotor durch UV-Bestrahlung. (modif. nach Eilers & Adhikary²).

1.7 Die Funktion von c-Myc in Physiologie und Tumorigenese

c-Myc besitzt ein großes Spektrum an physiologischen Funktionen und ist direkt oder indirekt an allen transformativen Veränderungen der Tumorigenese beteiligt. c-Myc besitzt eine große Anzahl von Zielgenen, die der großen Bandbreite seiner Funktionen entspricht. In den folgenden Abschnitten werden exemplarisch einzelne Funktionen von c-Myc Zielgenen dargestellt.

1.7.1 Zellzykluskontrolle

Eine Schlüsselfunktion von c-Myc ist seine Fähigkeit, den Zellzyklusablauf zu begünstigen. In ruhenden Zellen (G_0) ist keine c-Myc Aktivität nachweisbar²⁰¹. Nach Stimulation durch Mitogene oder Serum wird die Produktion von c-Myc mRNA angeregt²⁰². Am Beginn der G_1 Phase liegt der so genannte Restriktionspunkt (R-Punkt), an dem sich entscheidet, ob eine Zelle in die Phase der DNA-Synthese eintritt ($G_1 \rightarrow S$ Transition) und eine Zellzyklusrunde vollständig durchläuft. c-Myc kontrolliert diesen R-Punkt auf verschiedenen Ebenen.

Die $G_1 \rightarrow S$ Progression wird in eukaryotischen Zellen durch die Aktivität von Cyclin-abhängigen Kinase (Cdks) Komplexen gesteuert. c-Myc induziert die Bildung von Cyclin/Cdk Komplexen. Gleichzeitig inhibiert es Cdk Inhibitoren. So induziert c-Myc z. B. die Bildung des CyclinD2/Cdk4 Komplexes durch die Aktivierung der Transkription seiner Komponenten^{165, 203} und durch die Inhibierung der Cdk Inhibitoren p21Cip1 und p15Ink4a^{190, 193}. c-Myc induziert auch die Bildung von CyclinE/Cdk2 in der frühen G_1 Phase. Die Aktivierung der CyclinE/Cdk2 Kinase durch Hemmung des Cdk2 Inhibitors p27Kip1 ist von c-Myc abhängig. Durch die Bildung von CyclinD2/Cdk4 Komplexen wird die Aktivierung von CyclinE/Cdk2^{204, 205} und der proteasomale Abbau von p27Kip1 ausgelöst²⁰⁶⁻²⁰⁸. Weitere Zielgene von c-Myc in der Zellzykluskontrolle sind *cdc25A*²⁰⁹, *cak*²¹⁰, *cks2*¹⁸⁴, *cull1*²¹¹ und *Id2*²¹².

Durch diese Regulierungsmechanismen werden CyclinE/Cdk2 und CyclinD2/Cdk4 aktiviert. Zusammen mit der Sequestrierung von p27Kip1, der Hyperphosphorylierung von pRB und der Freisetzung von E2F wird der R-Punkt schließlich überwunden und der Zellzyklus schreitet von G_1 in die S-Phase fort (s. Übersicht Amati *et al.* 1998²¹³).

1.7.2 Zellwachstum

Damit Zellen den G_1 Restriktionspunkt überwinden können, müssen sie eine ausreichende Größe erreicht haben. Das Zellwachstum wird durch c-Myc verstärkt²¹⁴. Fibroblasten aus der Ratte, die kein c-Myc exprimieren, sind in der Zellproliferation und auch im Wachstum eingeschränkt²¹⁵.

Gesteigertes Wachstum konnte in B-Zellen aus transgenen E μ -Myc Mäusen und in humanen B-Zellen nachgewiesen werden^{216, 217}. Ähnliche Ergebnisse findet man auch in *Drosophila*²¹⁸. Im Laufe der Entwicklung von *Drosophila* findet eine Selektion zu

Gunsten von Zellen statt, die mehr dMyc exprimieren während Zellen mit weniger d-Myc durch Apoptose eliminiert werden ^{219, 220}.

Essentiell für das Zellwachstum ist die Proteinbiosynthese. Der Zusammenhang zwischen c-Myc und der Regulation von PolII und PolIII wurde bereits erläutert (s. 1.6.1). Neben der Regulation der Gene für die ribosomale RNA reguliert c-Myc auch Gene der Translationsinitiation. Zum Beispiel erhöht c-Myc die Expression der Initiationsfaktoren eIF4E und eIF2 alpha ²²¹. eIF4E besitzt eine Myc Bindestelle im Promotor und hat selbst onkogene Eigenschaften ²²². Die Initiation der Translation ist wichtig für die Regulation von Zellteilung und Zellwachstum. Daneben kontrolliert c-Myc diese Funktionen wahrscheinlich über die Regulation einer großen Anzahl von weiteren Zielgenen ¹⁸⁴.

1.7.3 Zelldifferenzierung, Adhäsion und Angiogenese

Zellproliferation und Differenzierung sind eng miteinander verbunden. Im Endstadium der Differenzierung schließen sich beide Vorgänge gegenseitig aus. Es ist daher nahe liegend, dass c-Myc nicht nur die Zellproliferation antreibt, sondern auch die Differenzierung aktiv verhindert.

Die Repression von c-Myc durch Antisense RNA blockiert die Freisetzung von Mitogenen und fördert die Differenzierung z. B. von promyelotischen Zellen ²²³. Demgegenüber kann die Überexpression von c-Myc die Differenzierung inhibieren ²²⁴.

Die Verstärkung der Proliferation durch die Repression von *p15Ink4B* ¹⁹³, *p21Cip1* ¹⁸⁹, *c/EBP alpha* ¹⁹⁶, *H-Ferritin* und *IRP2* ¹⁸³ sind Hauptmechanismen, durch die c-Myc die Differenzierung unterdrückt.

Der Verlust der Zell-Zell Adhäsion ist eine Voraussetzung für den malignen Verlauf der Tumorigenese und der Metastasierung. So führt die Repression der Integrine $\alpha L\beta_2$ und $\alpha_3\beta_1$ zu einem adhäsionsunabhängigen Wachstum von Tumorzellen ^{182, 225, 226}. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass c-Myc/Miz-1 Komplexe einige Zielgene in Keratinocyten, die an der Adhäsion und Differenzierung beteiligt sind, durch Bindung an deren Promotoren steuern ²²⁷. c-Myc induziert die Differentiation und den Verlust der Zellpolarisation von Epidermiszellen in Abhängigkeit von Miz-1. Diese Funktion könnte dazu beitragen, dass epidermale Stammzellen ihr Kompartiment in der Epidermis verlassen und durch die Repression von Adhäsionsgenen in den Differenzierungsprozess eintreten.

Solide Tumore können nur dann über eine Größe von 1-2 mm hinaus wachsen, wenn eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet ist. Dies setzt die Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) voraus. c-Myc kann die Neoangiogenese durch die Regulation von angiogenen Faktoren, wie VEGF (vascular endothelia growth factor), Angiopoietin-2 und den angiogenen Inhibitoren Thrombospondin-1 und Angiopoietin-1^{228, 229}, induzieren. In transgenen Mausmodellen führt die Aktivierung eines konditionalen *c-myc*-Allels in Keratinocyten *in vivo* zu einer reversiblen Hyperproliferation, einer Dedifferenzierung und zur Angiogenese des Gewebes. Gleiches gilt für die Expression eines konditionalen Allels von *c-myc* in β -Zellen des Pankreas^{230, 231}.

1.7.4 c-Myc und Apoptose

c-Myc kann sowohl die Zellproliferation fördern als auch die Apoptose auslösen²³²⁻²³⁵. Eine durch c-Myc induzierte Transformation und Tumorigenese wird dadurch begrenzt, dass c-Myc selbst in der Lage ist, die Apoptose sowie die zelluläre Seneszenz zu induzieren^{236, 237}. Bei zellulärem Stress oder bei fehlenden „survival“ Signalen löst ektopisch exprimiertes c-Myc in zahlreichen Ziellinien und in transgenen E μ -Myc Mäusen Apoptose aus^{236, 238}.

Man geht davon aus, dass die Apoptose-Funktion von c-Myc eine Schutzfunktion gegen die Zellentartung darstellt, wenn das Onko-Protein c-Myc in den Zellen akkumuliert. Diese Eigenschaft teilt c-Myc mit anderen Onko-Proteinen, wie z. B. E1A^{239, 240} oder E2F-1^{241, 242}. Für die Tumorigenese müssen transformierte Zellen den regulären c-Myc induzierten Apoptose-Signalweg deaktivieren oder umgehen. Die Induktion der Apoptose durch c-Myc ist von vielen Apoptose-Faktoren abhängig.

c-Myc induziert die Expression von p19Arf, einem Inhibitor der E3-Ubiquitin-Ligase Mdm2. Dadurch akkumuliert p53, welches nun nicht mehr durch Mdm2 ubiquitiniert und abgebaut werden kann, und löst die Apoptose aus²⁴³⁻²⁴⁵. Werden p19Arf oder p53 deletiert, kann c-Myc primäre Zellen immortalisieren. Die c-Myc induzierte Lymphomagenese wird dadurch begünstigt²⁴⁶.

Eine weitere Möglichkeit von c-Myc die Apoptose auszulösen, ist die Induktion von Bim (BH3-only Protein), die zur Freisetzung von Cytochrom c und der Aktivierung des pro-apoptotischen Proteins Bax führt²⁴⁷⁻²⁴⁹. Zusätzlich reprimiert c-Myc die anti-apoptotischen Proteine Bcl-X_L und Bcl2, was die Freisetzung von Cytochrom c fördert²⁵⁰.

Kürzlich konnten Patel und McMahon in 2 Studien zeigen, dass die Induktion der Apoptose die Inaktivierung von Miz-1 durch die Bindung von c-Myc erfordert. Sie demonstrierten, dass Miz-1 die Transkription des anti-apoptotischen Gens *bcl2* aktiviert. Die Inhibierung von *bcl2* ist für die Auslösung der Apoptose aber notwendig. Durch die Hemmung von *bcl2* kann die c-Myc Mutante V364D, die nicht an Miz-1 bindet, die Apoptose auslösen. Damit ist die Inhibierung der Miz-1 Aktivierung von *bcl2* durch c-Myc ebenfalls ein notwendiger Schritt in der Apoptose^{251, 252}.

Ebenso wird die Apoptose ausgelöst, wenn c-Myc DNA-Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen induziert²⁵³. Die deregulierte c-Myc Expression kann einen Zellzyklusarrest, der durch DNA-Schäden verursacht wurde, wieder aufheben und verloren gegangene Checkpointfunktionen wiederherstellen. Dadurch kann die Apoptose unterdrückt werden^{189, 190, 254}. Durch Verwendung von *c-myc* *-/-* Zellen und der c-MycV394D Punktmutante, bei denen die Miz-1 abhängige Repression fehlerhaft ist, konnte gezeigt werden, dass c-Myc *p21Cip1* nach UV-Bestrahlung reprimiert und damit den UV induzierten Zellzyklusarrest durch Bindung an Miz-1 wieder aufhebt¹⁸⁹.

Das Proto-Onkogen *c-myc* trägt entscheidend zur Balance von Zellteilung, Wachstum, Differenzierung und Zelltod bei. Die c-Myc Funktion ist daher auch ein Paradigma für das Umschalten eines Proto-Onkogens, das erforderlich ist für die Erhaltung der zellulären Homöostase, zu einem Onkogen, welches durch seine Deregulierung zu fast jedem Prozess der Transformation beiträgt.

1.7.5 Zelluläre Transformation durch c-Myc

Die physiologischen Transkriptionskontrollen des *c-myc* Gens sind in vielen menschlichen Tumoren ausgeschaltet, so dass c-Myc überexprimiert wird²⁵⁵. Allerdings ist eine unkontrollierte Expression von c-Myc nicht hinreichend, um Nager- oder Säugerzellen zu transformieren. Tumore aus c-Myc transgenen Mäusen sind klonalen Ursprungs, was darauf schließen lässt, dass weitere Gene Mutationen tragen müssen, damit Tumore entstehen. Für die Transformation primärer Nagerzellen in Kultur durch c-Myc ist die Kooperation mit einem zweiten Onkogen notwendig. Die Kooperation von c-Myc mit Proteinen des Ras Signalwegs, wie z. B. die Koexpression von c-Myc und konstitutiv aktivem Ras²⁵⁶, kann zur Transformation und zur Tumorigenese führen^{237, 257, 258}. Primäre humane Zellen lassen sich *in vitro* durch c-Myc und Ras alleine nicht transformieren. Dies ist jedoch durch eine kombinierte Überexpression von hTERT, Ras und der SV40 „early“ Region gelungen^{259, 260}.

Zwei Kontrollmechanismen, die eine c-Myc abhängige Transformation von Wildtyp Zellen verhindern, sind bisher bekannt: Erstens wird die c-Myc Funktion durch post-transkriptionelle Modifikationen in Ras-abhängigen Signalwegen kontrolliert. Zweitens gibt es Absicherungsmechanismen, wie etwa die Apoptose, die Zellen vor der c-Myc abhängigen Transformation schützen und daher erst inaktiviert werden müssen, damit sich Tumore bilden können.

Ras kontrolliert die c-Myc Funktion über drei Mechanismen:

1) Ras-abhängige Kinasen phosphorylieren c-Myc an den zwei Aminosäurenresten Thr58 und Ser62. Dadurch wird die Stabilität des c-Myc Proteins reguliert^{30, 31} (s. 1.2.1).

2) Einige c-Myc Zielgene, die in die Regulation der Zellproliferation involviert sind, werden durch Mitglieder der FoxO Transkriptionsfaktoren koreguliert. FoxO Faktoren werden durch Akt Protein-Kinasen phosphoryliert. Akt steht in der Signalkaskade unter Ras. Durch die Phosphorylierung werden die FoxOs aus dem Zellkern exportiert. In ihrer unphosphorylierten Form binden FoxOs direkt an c-Myc Zielgene und reprimieren diese über Hemmung der Bildung des Präinitiations-Komplexes am Promotor²⁶¹.

3) Die transkriptionelle Repression durch c-Myc wird über den PI3K Signalweg reguliert. c-Myc wird an Ser71 durch eine „downstream“ von PI3K gelegene Rho-abhängige Kinase phosphoryliert. Das führt zur verstärkten Repression von Thrombospondin²⁶². Weiterhin ist die DNA-Bindedomäne von Miz-1 ein Substrat für die Akt Kinase¹⁴⁷. Nach der Phosphorylierung binden 14-3-3 Proteine an Miz-1 und inhibieren die DNA-Bindung und die Aktivierung von *p21Cip1* und damit die Fähigkeit von Miz-1, die Zellproliferation zu unterdrücken¹⁴⁷.

Die Aktivierung von c-Myc wird über viele direkte und indirekte Mechanismen von Signalkaskaden gesteuert, wie z. B. durch Änderungen des c-Myc Genlokus oder veränderter c-Myc Stabilität. Ein Beispiel für die indirekte Wirkung von Signalkaskaden, welche die Expression von c-Myc induzieren oder reprimieren, sind die PDGF und Apc Signalwege^{20, 21, 263}. In kolorektalen Tumorzellen ist die Expression des Zellzyklusinhibitors *p21Cip1* wegen der Überexpression von c-Myc reduziert²¹. Bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen stellt die Transaktivierung von Tcf Zielgenen nach Induktion durch Mutationen im Wnt Signalweg das primäre transformierende Ereignis dar. Die Suppression der β -catenin/Tcf-4 Aktivität in kolorektalen Karzinom-Zellen führt zu einem G₁ Arrest.

Gleichzeitig wird ein Differenzierungsprogramm aktiviert. Durch die Repression von p21 kommt c-Myc eine entscheidende Rolle in diesem genetischen Schaltprogramm zu²¹. Die Repression von *p21Cip1* durch c-Myc ist dafür verantwortlich, dass c-Myc transformierte Zellen bei Schädigung ihrer DNA nicht mehr in den Zellarrest gehen können. p21 ist ein Cdk Inhibitor, der durch p53 in nicht transformierten Zellen nach DNA-Schäden induziert wird^{21, 189, 190}.

1.8 Fragestellung

Das c-Myc Protein ist ein wichtiger Schlüsselfaktor in vielen physiologischen Prozessen, wie dem Zellwachstum, der Zellproliferation, der Differentiation oder der Apoptose. *c-myc* ist ein Proto-Onkogen und die Deregulierung seiner Aktivität ist ein Charakteristikum vieler unterschiedlicher Tumore, die beim Menschen auftreten.

In den vorherigen Abschnitten wurde die Vielzahl von Funktionen des c-Myc Proteins im Zusammenspiel mit verschiedenen Partnern verdeutlicht. Dennoch sind viele Mechanismen der c-Myc Funktionen noch nicht ausreichend untersucht, um das große Spektrum seiner Einflüsse erklären zu können. Auch ist der Effekt, den c-Myc auf seine Zielgene ausübt, mit einer circa 2-3 fachen Veränderung relativ gering. Diese Tatsache lässt ebenfalls vermuten, dass c-Myc andere Funktionen zukommen als eine reine Transkriptionsregulation²⁵⁵. So zeigen neueste Forschungen, dass c-Myc an der Initiation der Replikation beteiligt ist²⁶⁴.

Es ist wahrscheinlich, dass c-Myc seine Rolle nur im Zusammenspiel mit anderen Proteinpartnern ausüben kann. Um die Biologie der Funktion des c-Myc Proteins weiter zu untersuchen, sollten zwei Strategien zur Auffindung von Kandidatenproteinen, die mit c-Myc bzw. seinem Interaktionspartner Miz-1 interagieren, etabliert werden:

Erstens sollte eine Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (TAP) für Miz-1 in humanen Zellen etabliert werden. Hierzu musste zunächst ein Miz-1-TAP- Fusionsprotein synthetisiert werden, das in seinen Eigenschaften dem Wildtyp Protein gleicht. Nach der Überexpression des Fusionsproteins in humanen Zellen sollte eine effiziente Aufreinigungsstrategie für das Fusionsprotein und dessen Interaktionspartner etabliert werden. Die mit der TAP-Strategie gereinigten Proteine sollten mittels Massenspektroskopie identifiziert werden.

Zweitens sollten mittels säulenchromatographischer Verfahren Multiproteinkomplexe, die c-Myc bzw. Miz-1 enthalten, soweit angereichert und

gereinigt werden, dass direkt aus dem Proteinkomplexbgemisch eine massenspektrometrische Identifizierung der enthaltenen Komplexkomponenten möglich wird. Hierzu musste zunächst ein Fraktionierungsschema zur Anreicherung und Reinigung etabliert werden.

Die Identifizierung von Kandidatenproteinen, die mit c-Myc interagieren, stellt einen wichtigen Schritt bei der Identifizierung neuer krebsrelevanter Gene und Signalwege dar, durch welche die c-Myc Funktion in der Tumorigenese besser verstanden werden kann.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme und Säugerzellen

XL1-Blue	E.coli <i>recA endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1lac</i> [<i>F'proABlacI^qZΔM15Tn10 (tet^r)</i>]
DH5α	E.coli <i>Fϕ80dlacZΔM15Δ(lacZYAaegF)U169 deoR recA1</i> <i>endA1 hsdR17 (r_Kⁱ,m_K⁺)phoA supE44 λ-thi-1 gyr A96 relA1</i>
HeLa	humane Zervix – Karzinom - Zelllinie (ATCC)
HEK293T	humane embryonale Nieren-Zelllinie (ATCC)

2.1.2 Primer für die Klonierung

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG, Ebersberg, synthetisiert und in lyophilisierter Form geliefert. Auf den Synthesescheinen ist die durch die Firma bestimmte Menge gelieferter Oligonukleotide angegeben sowie die erforderliche Menge Wasser, um eine Endkonzentration von 100 μM zu erhalten. Die Aufnahme der Pellets erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

Für die Klonierung des c-terminalen TAP „tags“ an Miz-1 wurden folgende Primer verwendet.

5'-primer: 5'-CGG ATA TCG CCA TGG GAC TTT CCC CA-3'

3'-primer: 5'-CCC AAG CTT CTC GGC AGG CGG GGG A-3'

2.1.3 Plasmide

pCMV –TAP	(CellZome; Heidelberg) Grundplasmid ist pEGFP-C1 (Clontech, Mountain View, CA, USA)
pCMV–Miz-1-TAP	Eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV (Cytomegalievirus) Promotor und einer TAP-„tag“-Kassette, vor die das <i>miz-1</i> Gen kloniert wurde
pcDNA3	Eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV (Cytomegalievirus) Promotor und T7 Promotor (Invitrogen, Kralruhe)
pcDNA3-c-Myc	pcDNA3 Vektor mit humaner c-Myc cDNA. Die cDNA stammt aus pBluescript KS-Myc
pcDNA3-Miz-1	pcDNA3 Vektor mit humaner Miz-1 cDNA. Die cDNA stammt aus pUHD-Miz-1
pcDNA3-eGFP	pcDNA3-Vektor mit kodierender Sequenz für eGFP
pGL2-hp15	Vektor mit dem Luziferase-Reportergen und einem Fragment des humanen <i>p15Ink4b</i> Promotors, das die Nukleotide von Position –2500 bis +160 relativ zum Transkriptionsstart umfasst
CMV-β-Gal	Vektor für die Expression von β-Galaktosidase in eukaryotischen Zellen (freundlicherweise von Stefan Gaubatz zur Verfügung gestellt)

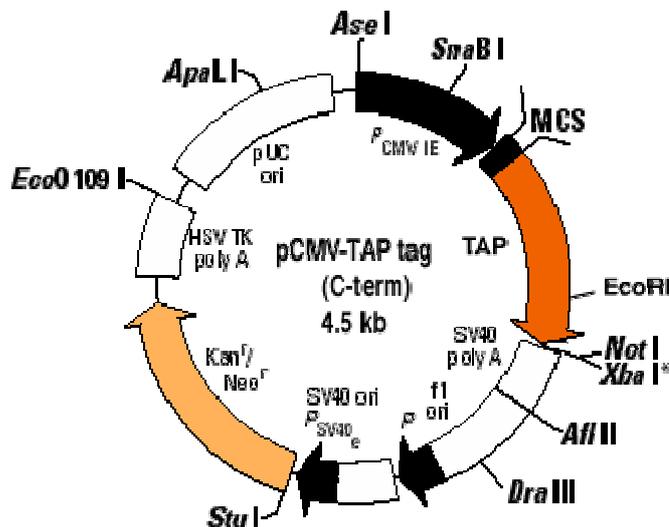


Abbildung 5. pCMV-TAP. Klonierungs- und Expressionsvektor für die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung. Miz-1 wurde in die MCS des Vektors kloniert. Quelle: Cellzome, Heidelberg.

2.1.4 Allgemeine Lösungen

Acrylamidstammlösung	30% (w/v) Acrylamid (Applichem, Karlsruhe) 0,8% (w/v) N,N'-Methylen-bisacrylamid in H ₂ O Lagerung: 4 °C, lichtgeschützt
β-Gal Substratlösung	6 mg/ml ONPG in H ₂ O
Bradford Reagenz	0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma, St. Louis, USA) 4,75% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Ortho-Phosphorsäure in H ₂ O; filtrieren, lichtgeschützt lagern
BSA	FraktionV (AppliChem, Darmstadt) als Referenzlösung: 1 µg/µl in NP-40 Lysepuffer
Desoxynukleosid-Triphosphat (dNTP)	Sigma, St. Louis, USA (100 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe (Stammlösung 10 mg/ml in H ₂ O)
Luziferase-Substratmischung	0,2mM D-Luziferin (Applichem, Karlsruhe), 25 mM Gly-Gly, pH 7,8
Propidiumjodid Lösung	Sigma, St. Louis, USA (Stammlösung 1 mg/ml)
Protein G-Sepharose	Sigma, St. Louis, USA Suspension in 20% (v/v) Ethanol / H ₂ O)
Proteaseinhibitoren	Protease Inhibitor Cocktail (Invitrogen, Karlsruhe)

2.1.5 Allgemeine Puffer

β-Gal-Reaktionspuffer	60 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 8,0 1 mM MgSO ₄ 10 mM KCl 50 mM 2-Mercaptoethanol
Blot Puffer(Western Blot)	10-20% (v/v) Methanol 150 mM Glycin 20 mM Tris-Base
6x DNA-Probenpuffer	40% (w/v) Saccharose 0,2% (w/v) Bromphenolblau 0,2% (w/v) Xylenyanol 10 mM EDTA pH 8,0
2x HBS	280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM Hepes-KOH pH 6.95-7.00
KPi-Puffer	100 mM K ₂ HPO ₄ pH mit 0,5 M KH ₂ PO ₄ auf 7,8 einstellen
Laufpuffer (SDS-Gelelektrophorese)	25 mM Tris/HCl, pH 8,3 0,2 M Glycin 0,1% (w/v) SDS
Luziferase-Reaktionspuffer	2 mM ATP, pH 7,0 0,1 M MgSO ₄ 25 mM Gly-Gly, pH 7,8
NP40-Lysepuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris, pH8,0 NP-40 1% (v/v)

Material & Methoden

PBS-Puffer pH 7,4	130 mM NaCl 3 mM KCl 6,4 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 mit HCl einstellen
3x SDS-Probenpuffer	4,8 ml 4x Trenngelpuffer 0,6 g SDS (6% SDS) 0,43 g DTT (0,3 M Dithiothreitol) kleine Spatelspitze Bromphenolblau 3,5 ml Glycerin ad 10 ml in H ₂ O
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA, pH 8,0
TBE-Puffer (0,5x)	45 mM Tris-Borat 2 mM EDTA, pH 8,0
20x TBS	1 M Tris/HCl, pH 7,4 3 M NaCl
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8,0
TES-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA 200 mM NaCl

2.1.6 Chemikalien

Soweit nicht besonders aufgeführt, wurden Chemikalien in Analysequalität oder in Qualität für die Molekularbiologie von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt) und Applichem (Heidelberg) bezogen. Feinchemikalien mit höchstem Reinheitsgrad wurden entweder von Sigma (Deisenhofen) oder Gibco-Life Technologies (Karlsruhe) verwendet.

Chemikalie	Firma, Sitz
NP-40	Calbiochem, Heidelberg
Agar, Bactopeptone, Bactotrypton	Difco, Heidelberg
ATP	Fluka, Seelze
TEMED	Gibco BRL, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol, Iso-Propanol, Methanol, NaCl, Formaldehyd 37%	Riedel de Haen, Seelze
Chloroquine	Sigma, St. Louis, USA
Tris, Phenol, Phenol / Chloroform, Tween-20, Glycerin, Glycin	Roth, Karlsruhe

2.1.7 Molekulargewichtsmarker

Protein-Marker	Full Range Rainbowmarker RPN 800 (Amersham, Freiburg)
	Low Range Rainbowmarker RPN 755 (Amersham, Freiburg)
DNA-Marker	1 Kb DNA Ladder 1 µg/µl (GibcoBRL, Karlsruhe)
RNA-Marker	0,24-9,5 Kb RNA Ladder, 1 µg/µl (GibcoBRL, Karlsruhe)

2.1.8 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	Amersham, Freiburg, Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Alkalische Phosphatase (shrimps)	Boehringer, Mannheim (1 U/μl)
T4-DNA-Ligase	Amersham, Freiburg (5 U/μl)
Pfu-TurboPolymerase	Stratagene, Amsterdam (2,5 U/μl)
TEV Protease	Invitrogene, Karlsruhe (1 U/μl)

2.1.9 Filme, Filter und Geräte

Filme	ECL Hyperfilm (Amersham)
Blotting-Membran für Proteine	Immobilon-P, PVDF Transfer Membran (Millipore)
Whatman-Filterpapiere	Gel-Blotting Papier (Schleicher und Schuell)
Begasungsbrutschränke	Heraeus BBD 6220
Biofuge	Heraeus Fresco
Luminometer Lumat LB 9507	Berthold
Mikroskop DMIRB	Leica
Megafuge1.OR	Heraeus
Primus Thermocycler	MWG
Sterilarbeitsbank	Heraeus HeraSafe
Schüttelinkubatoren Model G25	New Brunswick Scientific Co.INC
Transblot SD Apparatur	Biorad
Äkta Purifier 10/10	Amersham Pharmacia Biotech (GE Healthcare)

2.1.10 Antikörper

Erst – Antikörper:

anti-Miz-1

monoklonale Mausantikörper: Hybridomaüberstände
(J.Bartek): 10E2 für Western Blot

anti-c-Myc

monoklonaler Mausantikörper 9E10²⁶⁵ für Western Blot

Zweit-Antikörper:

anti-Kaninchen-HRP

Affinitätsgereinigter Antikörper (Amersham, Freiburg)
Esel anti-Kaninchen Immunglobulin

anti-Maus-HRP

Affinitätsgereinigter Antikörper (Amersham, Freiburg)
Esel anti-Maus Immunglobulin

2.1.11 Kit-Systeme

Western Blot

ECL Entwicklerlösungen Reagenzien 1 und 2
(Amersham, Freiburg)

Western Blot

ECL Detektions System Lösung A und B
(Amersham, Freiburg)

Gelfiltrationssäulen

ProbeQuant G-50 Micro Columns (Pharmacia, Freiburg)

Plasmid Maxi Kit

Qiagen-tip 500 (Qiagen, Hilden)

DNA-Isolationskit

QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden)

DNA-Aufreinigungskit

Nucleotrap Kit (Machery Nagel)

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterienzellkultur

2.2.1.1 Anzucht und Stammhaltung von Bakterien

Alle Arbeiten mit Bakterien wurden mit autoklaviertem Material unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Standardmäßig wurden die beiden Sicherheitsstämme XL-1 und DH5 α eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte in LB-Medium ggf. mit bzw. ohne 100 μ g/ml Ampicillin zur Selektion bei 37°C in Schüttelinkubatoren. Zur dauerhaften Lagerung wurden 0,5 ml einer Übernachtskultur mit 0,5 ml Glycerin versetzt und bei – 80°C gelagert.

LB-Medium	10 g Trypton
	5 g Hefeextrakt
	5 g Glucose
	ad 1000 ml H ₂ O, pH 7,0

2.2.1.2 Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock

Vor der Transformation wurden kompetente Bakterien durch CaCl₂ Behandlung hergestellt. Die Herstellung erfolgte durch 10minütiges Kühlen einer Bakteriensuspension (OD₅₉₀=0,35), anschließender Zentrifugation und Waschen in eiskaltem CaCl₂-Puffer. Danach wurde erneut zentrifugiert und in 2 ml eiskaltem CaCl₂-Puffer resuspendiert. Nach weiteren 2 Stunden im Eisbad wurden die Zellen entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder portioniert bei - 80°C eingefroren.

Zur Transformation wurden 100 μ l auf Eis aufgetaute transformationskompetente Bakterien mit dem einzubringenden Plasmid (1 ng-10 ng DNA) bzw. dem Ligationsansatz (siehe Ligation) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschockbehandlung für 45 sek bei 42°C im Heizblock wurden die Bakterien für 2 min auf Eis gekühlt, anschließend in 700 μ l LB-Medium ohne Ampicillin aufgenommen und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde anschließend auf LB^{Amp}-Agarplatten ausgestrichen. Von einer Einzelkultur wurde darauf hin eine Übernachtskultur mit Ampicillin angeimpft.

LB Agar	LB Medium
	1,5% (w/v) Bacto Agar

2.2.2 Säugerzellkultur

2.2.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Zellen in Adhäsionskultur wurden auf Polystyrol-Zellkulturschalen mit Durchmessern von 6 cm, 10 cm oder 15 cm (Nunc, Greiner) kultiviert. Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Zellen in Vollmedium in Heraeus BBD 6220 Begasungsbrutschränken bei 37°C, 96% relativer Feuchte und 5% CO₂ kultiviert. Alle Arbeiten mit Zellen, die für eine fortgesetzte Kultur vorgesehen waren, wurden unter sterilen Bedingungen in einer Steril-Arbeitsbank (Heraeus HeraSafe) durchgeführt.

Vollmedium für Säugerzellen	500 ml DMEM (Dulbeccos modified Eagles Medium), mit Phenolrot 50 ml FCS wärmeinaktiviert (30 min bei 56°C) 5 ml Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml) 5 ml L-Glutamin (200 mM)
-----------------------------	--

2.2.2.2 Passagieren von adhärennten Zellen

Sowohl HEK293T als auch HeLa Zellen wurden alle 2-4 Tage zwischen 1:5 und 1:20 verdünnt und neu ausplattiert (passagiert). Das Ablösen von der Kulturschale erfolgte durch Behandlung mit Trypsin-EDTA. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit sterilem PBS gewaschen, um Serumreste, die Proteaseinhibitoren enthalten, zu entfernen. Die Zellen wurden mit 1-2 ml Trypsin-EDTA Lösung überschichtet und circa 3 min bei 37°C inkubiert, bis sie sich vollständig von der Kulturschale gelöst hatten. Die abgelösten Zellen wurden dann in frischem Medium resuspendiert und entsprechend der gewünschten Endverdünnung in vorbereiteten Zellkulturschalen mit frischem Medium verdünnt.

2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur längeren Aufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert. Um Schäden durch das Einfrieren zu verhindern, wurden die Zellen in einem Einfriermedium langsam auf die Lagertemperatur abgekühlt. Zunächst wurden die Zellen trypsinisiert und bei 1.000 rpm in einer Heraeus-Minifuge für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in eiskaltem DMEM-Medium mit 25% (v/v) FCS

und 10% (v/v) DMSO (1 ml pro konfluenter 15 cm-Kulturschale) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde sofort auf vorgekühlte 1,8 ml Cryo-Röhrchen (Nunc) (je 1 ml) verteilt und diese dann auf -80°C abgekühlt.

Um Beschädigungen des Zellmaterials zu vermeiden, wurden die eingefrorenen Zellen (1 ml in 1,8 ml Cryo-Röhrchen) direkt von -173°C in ein 37°C warmes Wasserbad überführt und bis zum Antauen der Zellsuspension erwärmt. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 10 ml vorgewärmtem Medium gemischt und in einem 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß für 5 min bei 1.000 rpm in einer Heraeus-Megafuge bei 4°C abzentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert. Je nach Zelldichte wurden die Zellen dann auf 10 oder 15 cm Zellkulturschalen ausgesät.

Einfriermedium	DMEM-Vollmedium s.o. 20% FCS 10% DMSO
----------------	--

2.2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit einer modifizierten Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurde auf das Zählgitter der Kammer ein Deckglas so aufgebracht, dass so genannte Newton'sche Ringe erkennbar waren. Die Zellen wurden trypsinisiert, in einem definierten Volumen an Medium aufgenommen und auf die Zählkammer unter das Deckglas pipettiert. Anschließend wurden unter dem Mikroskop viermal sechzehn Felder der Neubauer-Zählkammer auf die Anzahl der vorhandenen Zellen ausgezählt. Um die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension zu ermitteln, wurde der Mittelwert pro sechzehn Felder berechnet und abschließend mit 10^4 multipliziert.

2.2.2.5 Anzucht von HEK293T Zellen in Suspensionskultur

Anzucht und Stammhaltung der embryonalen Nierenzelllinie HEK erfolgte in „Eagle's minimal essential medium“ (S-MEM) unter Zusatz von 5% (v/v) „new born“ Kälberserum, 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin-Lösung, 0,1 mg/ml Streptomycinsulfat und 2,2 mg/ml Natriumhydrogencarbonat. Bei Erreichen einer Zelldichte von $4-6 \times 10^5$ Zellen pro ml Medium wurden die Zellen weiterverwendet.

2.2.3 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.3.1 *Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien (MiniPräp, MaxiPräp)*

1 ml einer Übernachtskultur von transformierten Bakterien wurde für 1 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 110 µl STET-Puffer mit Lysozym (0,5 mg/ml) resuspendiert. Diese Suspension wurde zunächst für 5 min bei Raumtemperatur und dann für 1 min bei 95°C im Heizblock inkubiert und danach 15 min bei 13.000 rpm in einer Heraeus-Minifuge bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und dem Überstand 110 µl Isopropanol zugefügt. Mit einer erneuten Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 min bei 4°C wurde die DNA pelletiert. Die DNA wurde einmal mit 1 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 µl H₂O resuspendiert.

Plasmidpräparationen in präparativem Umfang (bis 500 µg) wurden mit einem DNA-Präparationskit (Qiagen-tip 500) der Firma Qiagen nach den Herstellerangaben durchgeführt.

STET-Puffer	8% (w/v) Saccharose
	0,5% (v/v) Triton X-100
	50 mM EDTA
	50 mM Tris-HCl, pH 8,0

2.2.3.2 *Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen*

DNA-Konzentrationen in wässrigen Lösungen wurden durch Extinktionsmessungen bei 260 nm in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm bestimmt. Die Reinheit der DNA wurde durch Vergleich mit der Absorption bei 280 nm bestimmt. Ein Quotient A_{260}/A_{280} von $1,8 \pm 0,1$ kennzeichnete eine ausreichend reine DNA-Präparation.

2.2.3.3 *Sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen*

Die sequenzspezifische, enzymatische Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte nach den vom Hersteller (Gibco) angegebenen Puffer- und Inkubationsbedingungen.

2.2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Um DNA-Fragmente kovalent verknüpfen zu können, wurden 10-50 ng linearisiertes Plasmid zusammen mit einem bis zu 10-fachen molaren Überschuss des einzusetzenden DNA-Fragments in Gegenwart von 1 µl T4-DNA Ligase, (5 U/µl) gemäß den Herstellerangaben der Firma Amersham inkubiert.

2.2.3.5 DNA-Gelelektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese diente der Analyse von Plasmiden, DNA-Fragmenten und der Überprüfung von Restriktionsreaktionen. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0,5 und 2% (w/v) gewählt. Die Agarose (Gibco) wurde in TAE-Puffer aufgekocht, auf ca. 50°C abgekühlt und mit 500 ng/ml Ethidiumbromid versetzt. Die mit DNA-Ladepuffer versetzten DNA-Proben wurden in die Geltaschen aufgetragen und elektrophoretisch bei 100-120 V aufgetrennt. Die DNA-Fragmente wurden mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht.

TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat
	1 mM EDTA, pH 8,0

2.2.3.6 Reinigung von DNA durch Phenolextraktion und Ethanolpräzipitation

Die Aufreinigung der DNA aus DNA/Proteingemischen, z. B. nach Restriktionsreaktionen, erfolgte durch Phenol-Extraktion. Hierzu wurden die DNA-Proben mit einem Volumenteil Phenol/Chloroform versetzt und gemischt. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei RT und 13.000 rpm wurde die wässrige Phase abgenommen, mit einem Volumenteil Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) versetzt und gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde die wässrige Phase erneut abgenommen, mit 1/10 Volumenteilen 5 M Na-Acetat und 2,5 Volumenteilen Ethanol versetzt und für 30 min bei 20°C zur Präzipitation der DNA inkubiert. Danach wurde die DNA durch Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm pelletiert, einmal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde anschließend in einem geeigneten (25 µl, 50 µl, 100 µl) Volumen H₂O oder TE-Puffer gelöst.

TE-Puffer	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA pH 8,0
-----------	---------------------------------------

2.2.3.7 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Präparationen aus Agarosegelen wurden mit einem DNA-Präparationskit der Firma Qiagen (Qiaex II Gel Extraction Kit) nach den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Abschnitten erfolgte mittels PCR (polymerase chain reaction). Ein typischer PCR-Reaktionsansatz bestand aus 1-10 ng Plasmid-DNA/Fragment-DNA, 10 x Reaktionspuffer (mit MgCl₂), je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 5 U/μl Taq-Polymerase bzw. Pfu Polymerase, jeweils 40 pmol/μl Primer-DNA. Die Amplifikation des DNA-Fragments erfolgte in einem Stratagene Thermocycler mit beheizbarem Deckel. Insgesamt wurden 30 Zyklen (präparativ) durchgeführt, wobei jeder Zyklus aus 3 Segmenten wie folgt bestand: 94°C, 1 min. Denaturierung; 54°C, 1,5 min. Hybridisierung; 72°C, 1,5 min. Elongation. Zu Beginn des ersten Zyklus wurde ein fünfminütiger Denaturierungsschritt bei 94°C durchgeführt. Nach Beendigung des letzten Zyklus folgte eine zehnminütige Elongation bei 72°C. Die PCR-Ansätze wurden auf ein präparatives Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und die gewünschte DNA-Bande ausgeschnitten. Die DNA wurde elektroeluiert, unter Standardbedingungen gefällt, in TE-Puffer (siehe 2.2.3.6) oder Wasser resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4 Arbeiten mit Proteinen

2.2.4.1 Präparation von cytoplasmatischem Extrakt (S100) aus HEK-Suspensionszellen

Die HEK-Suspensionszellen wurden durch zehnminütige Zentrifugation bei 1.000 g (1.300 rpm, 4°C) sedimentiert und mit Puffer 1 gewaschen. Nach Bestimmung des „packed-cell-volume“ (PCV) wurden die Zellen durch Aufnahme in 2,5 x PCV

Material & Methoden

hypotonem Puffer 2 und Inkubation für 20 Minuten im Eisbad zum Quellen gebracht. Zum Aufschluss der Zellen wurden diese im Potter homogenisiert, wobei die Vollständigkeit der Homogenisierung lichtmikroskopisch verfolgt wurde (Zerstörung der Zellmembran unter Erhalt der intakten Kerne). Nachdem durch Zufügen von 1/10 Volumenteil hypertonem Puffer 3 wieder isotonische Bedingungen hergestellt wurden, folgte eine Ultrazentrifugation für 90 Minuten bei 100.000 x g (= 33.000 rpm; Beckmann Ti 60) und 4°C, bei der Kerne und Zelltrümmer sedimentieren. Der „S100“-Überstand (S = Supernatant) wurde dekantiert, mit Glycerin auf eine Endkonzentration von ca. 10% Glycerin eingestellt, mit 3 mM DTT und 0,2 mM PMSF (100 mM in Isopropanol) versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Die Proteinkonzentration der Überstände betrug 10-15 mg/ml.

Puffer 1	30 mM Tris-HCl (pH 7,4) 150 mM NaCl	Puffer 2	10 mM Tris-HCl (pH 7,9) 10 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂
Puffer 3	300 mM Tris-HCl (pH 7,9) 1,4 M KCl; 30 mM MgCl ₂		0,5 mM DTT

2.2.4.2 Präparation von Kernextrakt aus HEK Suspensionszellen (modif. nach Shapiro, 1988²⁶⁶)

Bei einer Zelldichte von $4-7 \times 10^5$ Zellen/ml Medium wurden die Zellen durch zehnmünütige Zentrifugation bei 700 rpm (170 x g) und 4°C sedimentiert und dann in Puffer 1 (siehe unten) gewaschen. Das PCV („packed cell volume“) wurde durch Aufnahme der Zellen in 100 ml Puffer 1 bestimmt (PCV=x-100 ml). Die Zellen wurden in 5 x PCV (hypotonem) Puffer 2 aufgenommen und für 10 Minuten auf Eis gequollen. Nach erneuter Zentrifugation und Aufnahme in 2 x PCV Puffer 2 wurden die Zellen durch fünfmaliges Pottern aufgeschlossen. Um die noch intakte Kernmembran zu schützen, wurden zügig durch Zugabe von 0,1 VT Puffer 4 wieder isotone Verhältnisse geschaffen. Danach wurden die Kerne durch 30-60 Sekunden Zentrifugation bei 10.000 rpm im Sorvall HB4-Rotor pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet aus den Zellkernen wurde in $3 \text{ ml}/10^9$ Zellen Puffer 5 durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren in einer 10 ml Glaspipette homogenisiert und in ein Becherglas großen Durchmessers überführt. Über 10 Minuten wurden 0,1 Volumenteile der gesättigten Ammoniumsulfatlösung (gesättigte Lösung bei 0°C (>3,9 M Ammoniumsulfat)) tropfenweise zugesetzt und somit die Kerne aufgeschlossen. Nach weiteren 30 Minuten Rühren wurde die hochvisköse Lösung in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und 90 Minuten bei 40.000 rpm (180000 x g, Beckmann Ti-55.2, 4°C) zentrifugiert. Danach wurde vorsichtig eine kleine Lipidschicht abgehoben und der Überstand dekantiert. Dieser wurde unter zweimaligem Pufferwechsel 6-8 Stunden gegen Phosphocellulosepuffer (s. 2.2.4.3) dialysiert.

Puffer 1	30 mM Tris-HCl (pH 7,4)
	150 mM NaCl

Puffer 2	10 mM HEPES (pH 7,9) 0,75 mM Spermidin-3 HCl 0,15 mM Spermin-3HCl 0,1 mM EDTA (pH 8) 7,5 mM DTT 0,1 mM EGTA (pH 8) 10 mM KCl
Puffer 3	0,5 M Hepes (pH 7,9) 7,5 mM Spermidin-3 HCl 1,5 mM Spermin-3 HCl 100 mM KCl 2 mM EDTA 7,5 mM DTT
Puffer 4	9 Volumen 75% (w/v) Saccharose 1 Vol. Puffer 3
Puffer 5	20 mM Hepes (pH 7,9) 0,75 mM Spermidin-3 HCl 0,15 mM Spermin-3 HCl 0,2 mM EDTA 0,2 mM EGTA 7,5 mM DTT 25% Glycerin

2.2.4.3 Dialyse von Proteinlösungen

Die Dialyse von Zellextrakten oder gereinigten Proteinfractionen erfolgte bei analytischen Mengen (100-500 µl) in Mikro-Kollodiumhülsen der Firma Sartorius, bei präparativen Mengen (>1ml) in Dialysierschläuchen. Die Schläuche wurden zur Entfernung enzymatischer Verunreinigungen und zum Quellen vor Gebrauch kurz aufgeköcht. Der Puffer wurde vor Verwendung mit einer Wasserstrahlpumpe entgast. Die Proben wurden bei 4°C so lange gegen den gewünschten Puffer dialysiert, bis die Leitfähigkeit der Proben mit der des umgebenden Puffers übereinstimmte.

2.2.4.4 Proteinkonzentrationsbestimmung durch kolorimetrische Proteinquantifizierung

Mit Hilfe einer BSA-Referenzkurve wurde der Proteingehalt der Zelllysate bestimmt. Dazu wurden 1 µl, 2 µl, 4 µl, 6 µl und 8 µl einer Lösung von BSA (1 mg/ml) mit 150 mM NaCl-Lösung auf 100 µl aufgefüllt und mit je 1 ml Bradford-Lösung versetzt. In der gleichen Weise wurden 1 µl und 2 µl des Zelllysats eingesetzt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die OD₅₉₅ der Proben gegen einen Leerwert (Puffer) ohne Protein bestimmt. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde dann anhand der erstellten BSA-Referenzkurve ermittelt.

2.2.4.5 Umpuffern von Proteinlösungen per Gelfiltration

Mit der Gelfiltration können Moleküle ihrer Größe nach voneinander getrennt werden. Das Sephadex G25 Material wurde für das Abtrennen von Salzen aus Proteinlösungen eingesetzt, Proteine eluieren hier wesentlich früher von der Säule als Salze. Nach der Umpufferung befinden sich die Proteine in dem Puffer, der als Laufpuffer verwendet wurde. Vor dem Auftragen der umzupuffernden Proteinfraction wurde die Säule mit zwei Säulenvolumina Laufpuffer äquilibriert. Maximal 35 ml Proteinfraction wurden auf die Säule aufgetragen. Die Proteine wurden getrennt vom Salz gesammelt.

2.2.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen aus Zelllysaten erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese²⁶⁷ unter denaturierenden Bedingungen. Dabei hängt die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld neben der Durchlässigkeit der Matrix nur von deren Molekulargewicht ab.

Als Matrix dienten vertikale Gele aus mit Bisacrylamid vernetztem Acrylamid, die aus einem niedrigprozentigen Sammelgel und einem, je nach gewünschtem Auftrennungsgrad, 7-15 prozentigem Trenngel bestehen. Vor dem Beladen der Gele wurde die aufzutrennende Proteinlösung mit 3x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Laufzeit ist abhängig von dem gewünschten Auftrennungsgrad, der anhand eines mitlaufenden Größenstandards nachvollzogen werden konnte. Die aufgetrennten Proteinbanden konnten mittels verschiedener Verfahren (Coomassie-Färbung, Western Blot) sichtbar gemacht werden.

2.2.4.7 Western Blot

Mit dieser Methode erfolgte der Nachweis der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Im ersten Schritt wurden die Proteine im „*semi-dry*“ Verfahren aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Millipore) transferiert. Dazu wurde zunächst die Nitrocellulose-Membran unter Vermeidung von Verunreinigungen für 1 min in 100% Methanol, für 2 min in H₂O und für 5 min in Blot-Puffer inkubiert. Der elektrophoretische Transfer der Proteine erfolgte in einer Transblot SD Apparatur (Biorad) bei konstant 22 Volt für 40 min. Dem Blot-Puffer wurde 10% (v/v) Methanol für Proteine >50 kDa und 20% (v/v) Methanol für Proteine <50 kDa zugesetzt.

Die auf der Oberfläche der Nitrocellulose immobilisierten Proteine waren nun in weiteren Schritten immunologischen Reaktionen zugänglich. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Antikörper an die Membran wurde diese nach dem Transfer sofort in Blocklösung überführt und für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Blocklösung gegen frische ersetzt und dieser der primäre Antikörper in einer zuvor ermittelten Verdünnung (standardmäßig in einer Verdünnung von 1:500 bis 1:3.000, je nach verwendetem Antikörper) zugesetzt. In dieser Lösung wurde die Membran 3 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 15 min mit TBS-T gewaschen und für 2 h in Blocklösung mit einem sekundären, an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Antikörper (standardmäßig in einer Verdünnung von 1:3.000) inkubiert. Nach 4maligem 15minütigem Waschen mit TBS-T wurden die spezifischen Proteinbanden durch ein ECL oder ECL+ „Western Blotting Detection System“ (Amersham) auf Hyperfilm (Amersham) detektiert.

Blot-Puffer	25 mM TrisBase, pH 7,4 150 mM Glycin Methanol nach Proteingröße
Blocklösung (Western Blot)	5% (w/v) Magermilchpulver (Merck) in TBS-T
TBS-T	1x TBS/0,2% (v/v) Tween

2.2.4.8 Konzentrieren von Proteinlösungen für SDS-Gelelektrophorese mit Strataclean™ Resin

Diese Methode wurde zur Abtrennung von Proteinen (z. B. Restriktionsenzymen) von DNA entwickelt, kann aber auch zur Konzentrierung von Proteinfractionen benutzt werden. Das verwendete Resin weist bei neutralem pH eine extrem hohe Affinität zu Proteinen und eine extrem geringe Affinität zu Nukleinsäuren auf. Um Western Blot Analysen durchzuführen, wurden gesammelte Fraktionen aus Gelfiltrationen oder Ionenaustauschchromatographien auf diese Weise konzentriert. 10 µl (50% w/v) Stratagene™ Resin binden 5 µg BSA quantitativ. Die Fraktionen wurden mit 10-25 µl Strataclean® Resin versetzt und bei RT für 2 Stunden um die Querachse rotierend inkubiert. Danach wurde der Überstand bis auf ein geringes Restvolumen dekantiert, auf ein Kontroll-SDS-Gel aufgetragen und mit Coomassie-Blau gefärbt. Das Präzipitat wurde mit SDS-Probenpuffer versetzt und ebenfalls auf ein SDS-Gel aufgetragen. Durch den Stromfluss wurden die Proteine vom Resin elektroeluiert und liefen ins Gel ein.

2.2.4.9 Silberfärbung von Proteingelen

Diese Färbung wurde in der Regel im Anschluss an eine Coomassie-Blau Färbung durchgeführt. Die Fixierungslösung entfärbt die Coomassie-gefärbten Proteine vollständig. Das (Coomassie-gefärbte) Gel wurde mindestens über Nacht, besser 24 Stunden in Fixierungslösung inkubiert, um die Proteine im Gel zu fixieren. Danach wurde 2 x in Lösung 1 und 1 x in Lösung 2 für je 20 Minuten gewaschen. Das Gel wurde dann für genau 60 sec in Lösung 3 inkubiert und sofort danach in Aqua bid. 3 x 20 Minuten gewaschen. Danach wurde die Entwicklerlösung dem Gel zugefügt und solange inkubiert, bis die gewünschte Farbintensität erreicht war. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 2 x in Aqua bid. für 20 Minuten gewaschen und anschließend das Gel wieder in die Fixierungslösung übertragen. Das Gel wurde zur Dokumentation fotografiert.

Fixierungslösung	50% (v/v) Methanol 12% (v/v) Essigsäure
Lösung 1	50% (v/v) Ethanol
Lösung 2	30% (v/v) Ethanol
Lösung 3	0,8 mM Na ₂ S ₂ O ₃

Silberfärbelösung	2 g/l AgNO ₃ 0,026% Formaldehyd
Entwickler	60 g/l Na ₂ CO ₃ 0,0185% Formaldehyd 16 µM Na ₂ S ₂ O ₃

2.2.4.10 Anfärben von Proteinen mit SimplyBlue® SafeStain

Das nicht-fixierende Anfärben von Proteingelen erfolgte über SimplyBlue® SafeStain Kit der Firma Invitrogen entsprechend der Anleitung des Herstellers.

2.2.5 Chromatographische Fraktionierung von Protein Komplexen

Zellkernextrakte aus HEK-Suspensionszellen wurden durch Phosphocellulose-Chromatographie in die Fraktionen PC-A (Durchbruch, 100 mM KCl), PC-B (350 mM KCl), PC-C (600 mM KCl) und PC-D (1 M KCl) getrennt (3.7.1). Die Proteine Miz-1 und c-Myc fanden sich hauptsächlich in der PC-C Fraktion (2.2.5.1).

Die Standardreinigung der PC-C Fraktion erfolgte über eine 8 ml MonoQ-Säule. Die PC-C Fraktion wurde nach Dialyse gegen 1x Transkriptionspuffer aufgetragen und mit einem 160 ml Gradienten von 60-450 mM KCl eluiert. 40 Fraktionen von je 4 ml wurden gesammelt (s. 2.2.5.2). Die Fraktionen wurden entweder weiter gereinigt oder gegen 1 x Transkriptionspuffer dialysiert.

Die weitere Reinigung erfolgte, wie unten beschrieben, durch Größenausschlusschromatographie in analytischen oder präparativen Größenordnungen (s. 2.2.5.3).

Dazu wurden die Fraktionen der Größenfraktionierung, die Proteine mit einem Molekulargewicht größer 600 kDa enthielten, mittels einer erneuten MonoQ-Chromatographie weiter gereinigt und konzentriert. Die Elution erfolgte im präparativen Ansatz über einen 80 ml Gradienten von 200-350 mM KCl. Es wurden 22 Fraktionen von je 4 ml gesammelt (s. 2.2.5.2).

Je 3 Fraktionen des präparativen MonoQ Laufs, die Miz-1/c-Myc Komplexe enthielten (Fraktion 15-17, Fraktion 18-20), wurden zusammengefasst und mit Transkriptionspuffer ohne KCl auf 200 mM KCl verdünnt und jeweils auf eine 1 ml MonoS - Säule geladen. Die Elution erfolgte mittels eines 30 ml Gradienten von 200-600 mM KCl. Es wurden jeweils 30 Fraktionen von je 1 ml gesammelt (s. 2.2.5.2). Aus beiden MonoS Läufen wurde je eine Fraktion ausgewählt, die zur massenspektrometrischen Analyse weiterverwendet wurde.

2.2.5.1 *Reinigung von Proteinfractionen über Niederdruck-Chromatographie (Liquid Chromatography, LC), Phosphocellulose*

Die Phosphocellulose (Whatman P 11) musste vor Gebrauch mit NaCl in die Na⁺-Form gebracht und anschließend mit 5-10 Säulenvolumina (SV) Phosphocellulose (PC)-Puffer äquilibriert werden.

Der Auftrag des Zellextraktes erfolgte nach Dialyse gegen Phosphocellulosepuffer auf die Säule mit 0,5 Säulenvolumen pro Stunde. Die Durchbruchfraktion (PC-A)

wurde mit 100 mM KCl gewaschen, bis die Nulllinie des an eine UV-Einheit (280nm) angeschlossenen Schreibers erreicht war. Anschließend wurden die anderen Fraktionen mit 350 mM (PC-B), 600 mM (PC-C) und 1 M KCl (PC-D) eluiert. Das Proteinprofil wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Alle Fraktionen wurden gegen 60 mM KCl Transkriptionspuffer dialysiert

Phospho- cellulosepuffer	20 mM Hepes (pH 7,9)	Transkriptions- puffer	20 mM Tris/HCl (pH 7,9)
	100 mM KCl		10% (v/v) Glycerin
	3 mM DTT		60 mM bzw. 1 M KCl
	0,2 mM PMSF		5 mM MgCl ₂
	10% (v/v) Glycerin		3 mM DTT
			0,2 mM PMSF

2.2.5.2 *Reinigung von Proteinfractionen über Mitteldruck-Chromatographie*

Die bei der Niederdruck-Chromatographie über Phosphocellulose erhaltenen Fraktionen wurden mittels Mitteldruck-Chromatographie weiterverarbeitet.

Die Mitteldruck-Chromatographien wurden an einem Äkta Purifier von Amersham Pharmacia Biotech nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Säule [Anionentauscher Säulenmaterial: MonoQ (1 ml bzw. 8 ml Fertigsäule) bzw. MiniQ (0,7 ml Fertigsäule) Kationentauscher Säulenmaterial MonoS (1 ml Fertigsäule) bzw. MiniS (0,7 ml Fertigsäule)] wurde mit 4-6 Säulenvolumina Transkriptionspuffer (s. 2.2.3.1) äquilibriert. Es wurden maximal 5 mg Proteinfraction pro ml Säulenbett aufgetragen. Danach wurde je nach Anwendung mit einem Salzgradienten (KCl) oder mit mehreren Salzsritten eluiert. Die Flussrate war abhängig von der Größe der Säule und von dem entstandenen Druck. Gradienten wurden fraktioniert gesammelt. Die vollständige Elution der auf der Säule verbliebenen Proteine erfolgte mit 1 M KCl.

2.2.5.3 *Gelfiltration „Size Exclusion Chromatography“ (SEC)*

Mit Hilfe der Gelfiltration [„Size Exclusion Chromatographie“ (SEC)] werden globuläre Proteine ihrer Größe nach getrennt. Die Säule [Säulenmaterial: Superose 6 (XK 16/70 (analytisch und präparativ))] wurde vor Gebrauch mit mindestens 2 Säulenvolumina Transkriptionspuffer äquilibriert. Anschließend wurden maximal 200 µl (analytisch) bzw. 2 ml (präparativ) der zu analysierenden Proteinprobe aufgetragen

und Fraktionen von 1 ml (analytisch) bzw. 1-2 ml (präparativ) gesammelt. Mit Hilfe von Eichläufen, unter Verwendung von standardisierten Markerproteinen, konnte die Größe der zu analysierenden Proteine und Proteinkomplexe in den einzelnen Fraktionen bestimmt werden (Tabelle 2).

Tabelle 2: Eichlauf für Superose 6 SEC

Marker	Molekulargewicht (kDa)	Elutionsvolumen (ml)
BSA	66	17,1
Alkoholdehydrogenase	150	16,4
beta - Amylase	200	15,65
Apo-Ferritin	443	14,8
Thyroglobulin	669	13
Kinase	1300	11
Dextranblau	2000	10
Vo	10000	8,12

SEC size exclusion chromatography, kDa Kilodalton, ml Milliliter, BSA Rinderserumalbumin, Vo Ausschlussvolumen

2.2.5.4 Massenspektrometrische Untersuchung mittels HPLC-MS

Sowohl die Analyse der Proteingemische aus der präparativen Chromatographie als auch die Analyse der SDS-Gel Banden aus der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (s.u.) mittels HPLC-MS wurden im Labor von Dr. Thomas Ruppert am ZMBH in Heidelberg durchgeführt.

Die Identifizierung der Proteine aus den Peptidmassen wurde mit der MASCOT® Software der Firma Matrix Science, Boston, USA durchgeführt. Die Software verwendet einen Algorithmus zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit, mit der die gemessenen Massewerte mit den Werten in der Datenbank übereinstimmen. Dieser Algorithmus berechnet den Mowse-Score, mit der die Signifikanz einer Identifizierung angegeben werden kann. Je höher der Mowse-Score desto signifikanter ist die Übereinstimmung. (www.matrixscience.com). Umgekehrt kann ein Mowse-Score angegeben werden bei dem ein bestimmtes Signifikanzniveau erreicht wird. Im Falle der vorliegenden Arbeit entsprach eine Mowse-Score von 33 einem p-Wert von 0.05.

2.2.6 Tandem-Affinitäts-Aufreinigung

Die Entwicklung einer dualen Proteinaufreinigungsstrategie, die so genannte Tandem-Affinitäts-Aufreinigung („tandem affinity purification“, TAP), stellt eine große Verbesserung hinsichtlich der Spezifität bei der Identifizierung von Protein-

Protein-Interaktionen dar. Die Methode ist nicht alleine abhängig von der Affinität einer Antigen-Antikörper Interaktion, sondern nutzt zwei Aufreinigungsschritte ²⁶⁸. Durch das Anhängen („tagging“) eines Epitops an ein Protein kann das Protein zusammen mit seinen Interaktionspartnern aufgereinigt werden. Die Fusion des „tags“ geschieht unter Erhaltung des Leserasters.

Bei der hier verwendeten Tandem-Strategie besteht das Epitop aus einem proximalen und einem distalen Teil. Der distale Teil stammt aus der IgG bindenden Proteinsequenz des *S. aureus* Proteins A; der proximale Teil ist ein Calmodulin-bindendes Peptid (calmodulin binding peptide, CBP). Die beiden Teile sind durch eine Spaltsequenz („cleavage site“) der TEV (tobacco etch virus) Protease getrennt. Diese Sequenz erlaubt eine gezielte Trennung der beiden Teile des Epitops. Das TAP-Fusionsprotein wird in einer Zelllinie stabil oder transient exprimiert und nach dem Reinigungsprotokoll zusammen mit den bindenden Proteinen aufgereinigt.

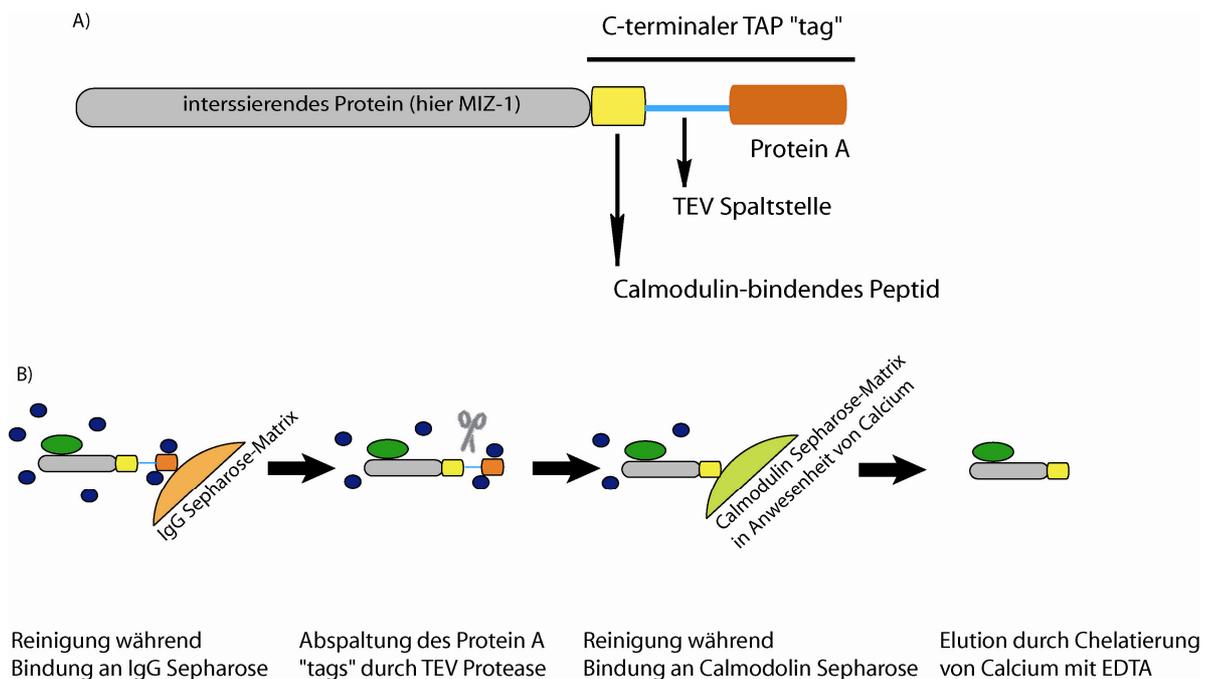


Abbildung 6. Tandem-Affinitäts-Aufreinigung. A) Struktur des C-terminal fusionierten Proteins (Miz-1-TAP). B) Reinigungsprozedur. Das grüne Oval zeigt einen *bona fide* Bindungspartner von Miz-1, die violetten Ovale zeigen Kontaminanten (nach Rigaut *et al.* ²⁶⁸).

Zunächst wird das Fusionsprotein (mit den daran bindenden Polypeptiden) nach dem Zellaufschluss auf IgG-Sepharose durch Bindung des Protein A Teils immobilisiert und vorsichtig gewaschen. Dann werden die immobilisierten Proteine mit TEV Protease inkubiert, um den Proteinkomplex von der IgG-Matrix freizusetzen.

Unspezifisch an IgG bindende Proteine bleiben an der Matrix haften. Im zweiten Schritt wird der Proteinkomplex an Calmodulin-Sepharose in Gegenwart von Calcium gebunden. Nach wiederholtem Waschen wird das rekombinante Protein zusammen mit bindenden Proteinen durch EDTA-Chelatierung des Calciums freigesetzt. Die unspezifisch an Calmodulin bindenden Proteine verbleiben wiederum an der Matrix.

Die gereinigten Proteine werden daraufhin präzipitiert und mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die separierten Banden wurden aus dem Gel geschnitten und die entstandenen Peptide nach Proteaseverdauung durch massenspektroskopische Verfahren identifiziert.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode wie folgt durchgeführt:

Für analytische Versuche wurden je sechs 14 cm Schalen mit Miz-1-TAP transfizierten bzw. Mock-transfizierten HEK293T Zellen verwendet. Für präparative Untersuchungen wurden je zwanzig 14 cm Schalen mit Miz-1-TAP transfizierten bzw. Mock-transfizierten HEK293T Zellen verwendet. Zur Zelllyse wurden die Zellen 1-mal mit kaltem PBS gewaschen und danach im Kühlraum auf Eis gehalten. Pro 14 cm Schale wurden 1,5 ml Lyse-Puffer auf die Zellen gegeben und die Platten für eine Stunde im Kühlraum geschwenkt. Danach wurden die Zellen von den Platten geschabt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße übertragen und für 5 Minuten bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde danach direkt auf die IgG-Sepharose Säulen gegeben. Zur Vorbereitung der IgG-Sepharose Säulen wurden pro Säule 300 µl IgG-Sepharose zweimal mit je 1 ml IPP150-Puffer gewaschen und 30 Sekunden bei 2.000 rpm abzentrifugiert und in die Säulenbehälter gegeben. Für analytische Versuche wurde nur 100 µl IgG-Sepharose verwendet. Zelllysate und IgG-Sepharose wurden im Säulenbehälter über Nacht unter Schütteln inkubiert. Die Säulen wurden danach 3-mal mit je 10 ml IPP150-Puffer, dann 1-mal mit TEV Cleavage Puffer gewaschen. Danach wurde die untere Öffnung der Säule verschlossen und 1,5 ml TEV Cleavage Puffer sowie 200 U TEV Protease hinzugegeben. Für analytische Aufreinigungen wurde 50 U TEV Protease verwendet. Nach Verschluss der oberen Öffnung der Säule wurde für 4 Stunden bei 16°C unter Schütteln inkubiert.

Zur Vorbereitung des Calmodulin-Resins wurden 350 µl Calmodulin-Resin 1 min bei 2.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Resin mit 1 ml IPP150-Calmodulin-Bindepuffer gewaschen. Das Resin wurde daraufhin in eine neue Säule gegeben, so dass sich das Resin absetzen konnte. Dann wurde das Resin erneut mit 10 ml IPP150-Calmodulin-Bindepuffer gewaschen. Das Eluat aus der IgG-Säule

wurde als Kontrolle in ein Reaktionsgefäß übertragen und die IgG-Säule mit 200 µl TEV Puffer gewaschen. Nach dem Waschen wurden 4,5 ml IPP150-Calmodulin-Bindepuffer und 4,5 µl 1 M CaCl_2 Lösung auf die Calmodulin-Säule gegeben. Dann wurde das TEV Eluat auf die Calmodulin-Säule aufgebracht und 3 Stunden bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Zur Elution des aufgereinigten Komplexes wurde zuerst der obere Deckel der Säule geöffnet, dann der untere, so dass sich das Calmodulin-Resin absetzen konnte. Die Säule wurde dreimal mit je 10 ml IPP150-Calmodulin-Bindepuffer gewaschen, danach verschlossen und 1 ml Calmodulin-Elutionspuffer zugefügt. Auf einem Rotationsschüttler wurde 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Eluat in einem Mikroreaktionsgefäß aufgefangen und zur TCA-Präzipitation auf ein Gesamtvolumen von 1.000 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Nach Zusatz von 100 µl einer 15% (w/v) Natrium-Deoxycholat Lösung, Schütteln und 5minütiger Inkubation bei RT wurden 200 µl einer 72% TCA-Lösung zugefügt und 60 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde das Präzipitat bei 10.000 g 15 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und 1 ml eiskaltes Aceton dem Pellet zugefügt. Nach weiteren 15 Minuten Zentrifugation bei 10.000 g und erneutem Waschen mit Aceton wurde der Überstand dekantiert und das Pellet an der Luft getrocknet. Daraufhin wurde das Pellet in 20 µl destilliertem Wasser gelöst und mit Probenpuffer für die SDS-Gelelektrophorese versetzt. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie oder Silbernitrat gefärbt. Das Ausschneiden der Banden sowie die massenspektrometrische Untersuchung erfolgten im Labor von Dr. Thomas Ruppert, Heidelberg.

Lyse-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 250 mM NaCl 10 mM MgCl_2 0,1% NP40 2 mM Natriumorthovanadat Pro 10 ml Lyse-Puffer wurden frisch hinzugefügt: 1 µl Roche Complete Protease Inhibitor 50 µl Roche DNaseI 1 mM DTT 10 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail
IPP150-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 250 mM NaCl

Material & Methoden

	0,1% NP40
TEV Cleavage Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 250 mM NaCl 0,1% NP40 0,5 mM EDTA Frisch: 1 mM DTT
IPP150-CBB Calmodulin-Bindepuffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 250 mM NaCl 1 mM Mg-Acetat 1 mM Imidazol 0,1% NP40 2 mM CaCl ₂ Frisch: 1 mM DTT
IPP150-CEB Calmodulin-Elutionspuffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 250 mM NaCl 1 mM Mg-Acetat 1 mM Imidazol 0,1% NP40 2 mM EGTA Frisch: 10 mM β -Mercaptoethanol

3 Ergebnisse

3.1 Tandem-Affinitäts-Aufreinigung

Ziel der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung war, das TAP „tag“ an das Miz-1 Protein zu fusionieren und das entstandene Fusionsprotein in den Wirtszellen mit einer hohen Ausbeute zu synthetisieren. Das überexprimierte Fusionsprotein und die daran bindenden Proteine sollten dann in einer Affinitäts-Aufreinigungsprozedur von unspezifisch bindenden Kontaminanten getrennt werden. Der aufgereinigte Proteinkomplex wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und die einzelnen Bestandteile massenspektrometrisch mittels LC-MS identifiziert.

3.1.1 Synthese des Miz-1-TAP Fusionsproteins

Das TAP „tag“, bestehend aus zwei IgG-Bindedomänen des *Staphylococcus aureus* Proteins A (ProtA) und einem Calmodulin-bindenden Protein (CBP), getrennt durch eine TEV Spaltstelle (tobacco etch virus protease cleavage site), wurde carboxyterminal an das Miz-1 Protein fusioniert. Mittels transients Transfektion wurde das Konstrukt in HEK293T Zellen eingebracht und überexprimiert. Der leere pCMV-TAP Vektor fungierte als Kontrolle (Abbildung 7)

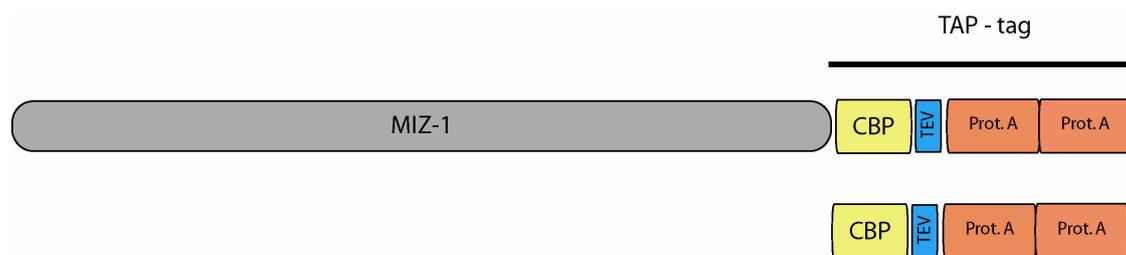


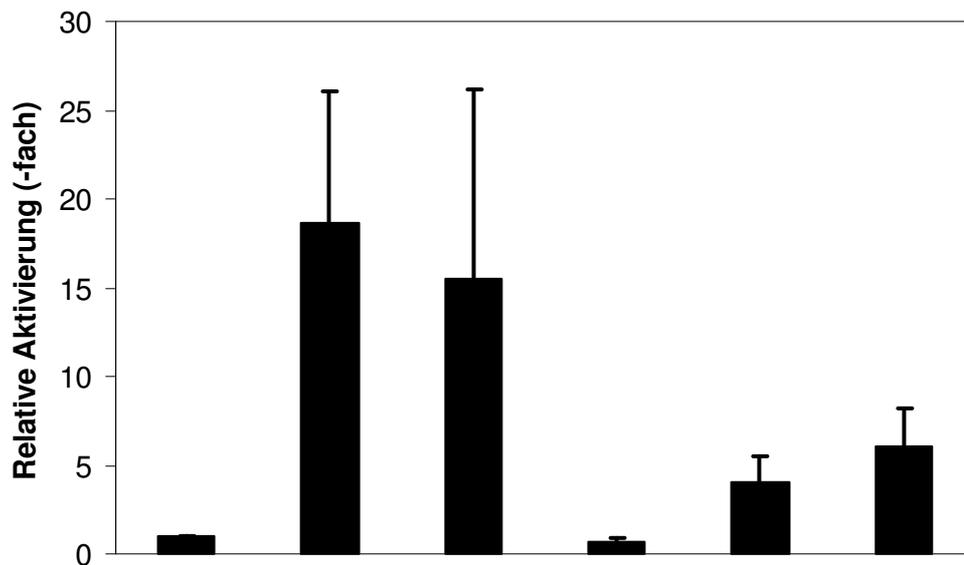
Abbildung 7. Schematische Struktur des Miz-1-TAP Fusionsproteins und des TAP Peptid-„tags“. Der Tandem-Affinitäts-„tag“, bestehend aus dem Calmodulin-bindenden Protein (CBP), einer Spaltsequenz für die TEV Protease (TEV) und einer doppelten Protein A-Sequenz, wurde carboxyterminal an das Miz-1 fusioniert (modif. nach Rigaut *et al.* ²⁶⁸).

3.1.2 Funktionalität des Miz-1-TAP Konstrukts

Zunächst musste überprüft werden, ob sich die Fusionierung des TAP „tags“ an das Miz-1 Protein auf die Miz-1 Funktion auswirkt. Damit sollte sichergestellt werden, dass der relativ große TAP „tag“ (ca. 25 kDa) die Proteinfunktion des Miz-1 Proteins nicht beeinträchtigt. Außerdem wurde die Funktion des TAP Konstrukts überprüft, um Fehler am Konstrukt selbst auszuschließen.

3.1.2.1 Aktivierung und Repression durch Miz-1-TAP und c-Myc

Eine bekannte Funktion von Miz-1 ist die Transaktivierung des *p15Ink4b* Promotors. Diese wiederum kann von c-Myc gehemmt werden. Bei einem funktionalen Miz-1-TAP Konstrukt sollte demnach eine ähnliche Transaktivierung bzw. Hemmung durch c-Myc am *p15Ink4B* Promotor nachweisbar sein ¹⁹³.



pCMV	15	5	5	10	-	-	(µg)
c-Myc	-	-	-	5	5	5	(µg)
Miz-1wt	-	10	-	-	10	-	(µg)
Miz-1TAP	-	-	10	-	-	10	(µg)

Abbildung 8. Regulation des *p15Ink4B* Promotors durch das Miz-1-TAP Konstrukt und c-Myc. Die Expression von c-Myc vermindert die Transaktivierung des Miz-1 wt Proteins und die des Miz-1-TAP Konstrukts. Es wurden je 10 µg der pCMV-Miz-1 bzw. pCMV-Miz-1-TAP Vektoren verwendet und 3 µg eines pCMV-c-Myc Konstrukts. Als Kontrolle diente der pCMV TAP Vektor.

In Luziferase-Reporter-, „Assays“ wurde untersucht, ob das Miz-1-TAP Konstrukt bei der Aktivierung des *p15Ink4B* Promotors gleiche Eigenschaften aufweist wie das Miz-1 wt Protein. Es zeigte sich, dass Miz-1-TAP und Miz-1 wt das p15-GL2-Promotorkonstrukt in vergleichbarer Stärke aktivieren und dass diese Aktivierung durch gleichzeitige Transfektion von c-Myc wieder gehemmt wird (Abbildung 8).

3.1.2.2 *Miz-1-TAP ist im Zellkern angereichert und seine TEV Spaltstelle ist funktional*

Um seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben zu können, muss das Miz-1-TAP Fusionsprotein in den Zellkern transportiert werden. Um das Vorhandensein im Zellkern nachzuweisen, wurden gleiche Mengen Proteinextrakt von ganzen Zellen (Gesamtzelllysat) und aus Kernextrakten im Western Blot verglichen. Auf Grund der Protein A Domäne des TAP „tags“ konnte der Nachweis von Miz-1-TAP mit HRP-gekoppelten Antikörpern (IgG) aus Kaninchen geführt werden.

Der Vergleich der Proteinmengen von Gesamtzellextrakt und Kernextrakt zeigte, dass (bei Auftrag gleicher Proteinmengen) Miz-1-TAP im Kernextrakt angereichert war. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Miz-1-TAP in den Zellkern transportiert wurde (Abbildung 9).

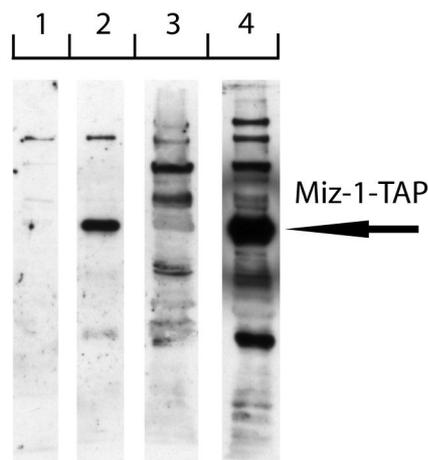


Abbildung 9. Lokalisation von Miz-1-TAP. Western Blot mit anti-Kaninchen Zweitantikörper, der den Protein A-Teil des Miz-1 TAP-„tags“ erkennt. Der größere Anteil des Miz-1-TAP Proteins ist im Kernextrakt zu finden. Bahn 1: Gesamtzellextrakt mock transfizierte Kontrolle, Bahn 2: Gesamtzellextrakt der Miz-1-TAP Transfektion, Bahn 3: Kernextrakt mock-transfizierte Kontrolle, Bahn 4: Kernextrakt der Miz-1-TAP Transfektion; aufgetragen sind je 10 µg Protein.

3.1.3 Miz-1-TAP Aufreinigung im analytischen Maßstab

Um zunächst die Bedingungen für eine TAP-Aufreinigung zu definieren, wurden Transfektionen und Aufreinigungen im analytischen Maßstab durchgeführt. Hierzu

wurden jeweils zwei 14 cm Schalen HEK293T Zellen mit Miz-1-TAP bzw. mit der Kontrolle (pCMV-TAP) transfiziert.

Die in den einzelnen Aufreinigungsschritten gewonnenen Eluate (Eluat nach TEV Spaltung und EDTA-Eluat, sowie das Ausgangslysat) wurden mit der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western Blot (Abbildung 10), Silberfärbung (Abbildung 11) und kolloidaler Coomassie-Färbung untersucht.

Die Western Blot Analyse ergab, dass sowohl die Transfektion als auch die Spaltung durch die Protease des Tobacco etch virus (TEV) erfolgreich waren (Abbildung 10). Durch die TEV Spaltung werden die beiden IgG-Bindemotive aus *Staphylococcus aureus* Protein A abgetrennt und das Fusionsprotein carboxyterminal verkürzt; die trunkierte Variante erschien im Gel ca. 25 kDa kleiner.

Die Bahnen 1 und 2 zeigen das Ausgangslysat der HEK293T Zellen vor der TAP Aufreinigung. In den Bahnen 1, 3, 5 (Kontrolltransfektionen mit pCMV-TAP) konnte kein Miz-1-TAP Fusionsprotein nachgewiesen werden. Der Vergleich der Bahnen 4 und 6 mit Bahn 2 zeigt, dass das Produkt aus der TEV Spaltung ein geringeres Molekulargewicht aufweist. Der Grad der Anreicherung kann durch den Vergleich der Mengen an Miz-1-TAP Protein in den jeweiligen Stufen der TAP Aufreinigung abgeschätzt werden.

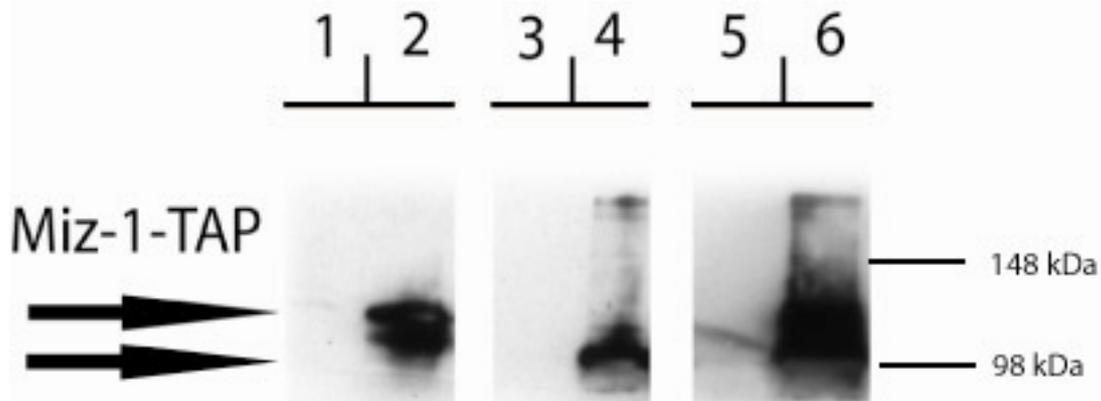


Abbildung 10. TAP Aufreinigungsstufen. Anti-Miz-1 Western Blot mit dem 10E2 Antikörper. Der obere Pfeil kennzeichnet überexprimiertes Miz-1-TAP im Ausgangsproteinlysat vor der Spaltung mit TEV Protease (Bahn 2). Der untere Pfeil kennzeichnet Miz-1-TAP nach der TEV Spaltung (Bahn 4) und das Endprodukt der Aufreinigung (Bahn 6). Aufgetragen sind je 0.25% des Ausgangslysats, 0.6% des TEV Eluats und 10% des EDTA-Eluats. Die Bahnen 1, 3, 5 sind die jeweiligen Kontrollen mit CMV-TAP transfiziertem Lysat.

Für die Abschätzung der Anreicherung des Miz-1-TAP Fusionsproteins wurde von folgenden Annahmen ausgegangen: Die Bandenstärke des Blots in Abbildung 10 steht im Verhältnis Bahn 2 : Bahn 4 : Bahn 6 wie 1 : 0,5 : 2. Es wurden je 10µl Proteinlysate aufgetragen, jeweils von 4.000µl Ausgangsproteinlysate (1µg/µl), 1.500 µl TEV Eluat und 100 µl Endprodukt. Damit stehen die Miz-1-TAP Konzentrationen der drei Lysate im Verhältnis von etwa 1 : 0,75 : 0,0125. Somit hat sich die Miz-1-TAP Menge während der Aufreinigung um etwa den Faktor 80 verringert.

Auf dem mit Silber gefärbten Gel (Abbildung 11) findet sich in Bahn 6 auf einer Höhe von über 100 kDa eine angereicherte Bande. Auf dieser Höhe sollte sich das Aufreinigungsendprodukt befinden. In der Silberfärbung wird beim Vergleich der Bahnen 5 (Kontrolltransfektion) und 6 (Miz-1-TAP Transfektion) deutlich, dass die meisten der sichtbaren Banden unspezifische Wechselwirkungen darstellen und nur wenige Banden auf Interaktionen mit dem Miz-1 Protein hinweisen.

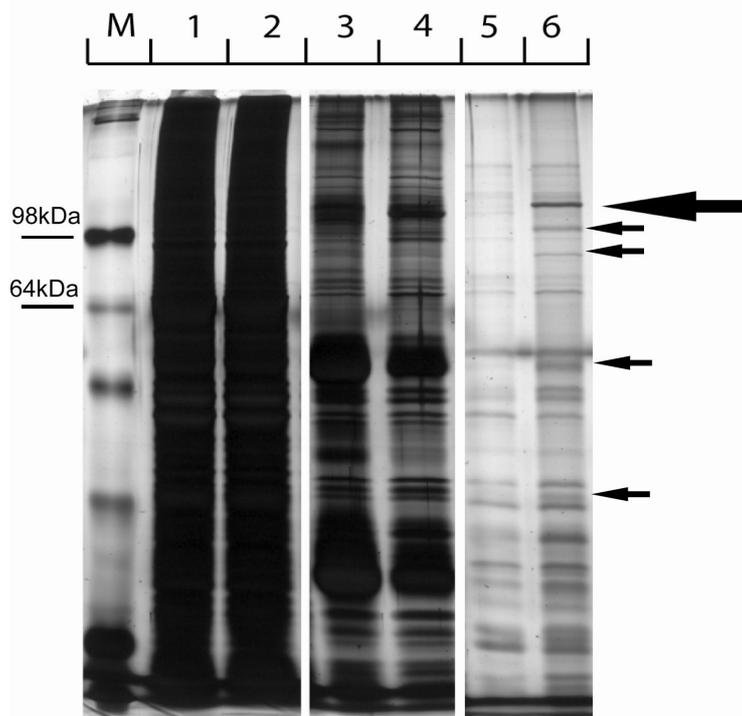


Abbildung 11: Silber-Färbung des SDS-Gels der TAP Reinigungsstufen. M: Marker. Bahn 1: Ausgangslysate Kontrolle. Bahn 2: Ausgangslysate Miz-1-TAP Transfektion. Bahn 3 Eluat nach TEV Spaltung Kontrolle. Bahn 4: Miz-1-TAP Eluat nach TEV Spaltung. Bahn 5: Endprodukt der Reinigung Kontrolle. Bahn 6: Endprodukt Miz-1-TAP Transfektion. Der große Pfeil kennzeichnet ein angereichertes Protein bei 100 kDa, das vermutlich Miz-1 darstellt. Nur wenige differentielle Banden konnten sichtbar gemacht werden (s. kleine Pfeile).

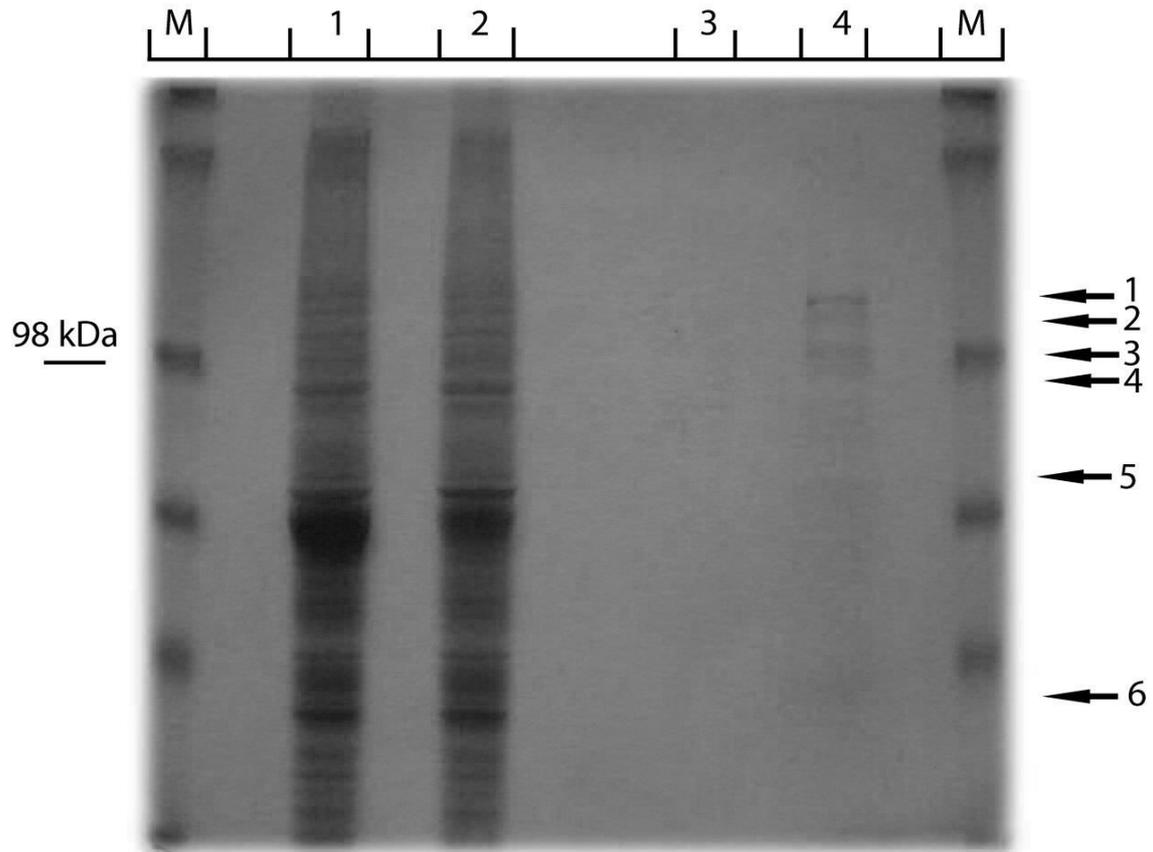


Abbildung 12: Banden für LC-MS. Präparatives 10% SDS-Gel mit kolloidalem Coomassie gefärbt. M Marker. Bahn 1: Kontroll Input. Bahn 2: Miz-1-TAP transfizierter Input. Bahn 3: Endprodukt aus TAP Aufreinigung Kontrolle. Bahn 4: Miz-1-TAP transfiziertes Endprodukt. Die nummerierten Pfeile zeigen die Banden für die massenspektroskopische Identifizierung (zur Sichtbarmachung der Banden wurde die Abbildung mit einem Rotfilter bearbeitet). Siehe Tabelle 2.

3.1.4 Das Chaperon Hsp70 als möglicher Interaktionspartner von Miz-1

Um mögliche Interaktionspartner von Miz-1 in ausreichender Menge mit der TAP Methode aufzureinigen, wurde ein Protokoll mit transienten Ansätzen mit je 20 14 cm Schalen HEK293T etabliert. Abbildung 12 zeigt das Ergebnis einer solchen Aufreinigung als SDS-Gel mit kolloidaler Coomassie-Färbung. Zur besseren Kenntlichmachung der ausgeschnittenen Banden wurde das Foto des Gels mit dem Programm Adobe Photoshop® bearbeitet. Die Bahnen 1 und 2 zeigen das Ausgangslysat von Zellen, die mit dem Kontrollplasmid (pCMV-TAP) transfiziert wurden und das Proteinlysat aus Zellen, die mit Miz-1-TAP transfiziert wurden. Auf

Ergebnisse

den Bahnen 3 und 4 sind jeweils 50% des Endprodukts der Aufreinigung aufgetragen. Sechs unterschiedliche Banden konnten für eine massenspektroskopische Untersuchung verwendet werden. Tabelle 3 gibt die Ergebnisse der LC/MS Experimente wieder. In zwei der untersuchten Banden (3, 6) war die Proteinkonzentration zu gering, um die Polypeptide zu identifizieren. Die Banden 1, 2 und 4 stellen das Miz-1 Protein dar. Somit ist eine Aufreinigung des TAP markierten Miz-1 Proteins gelungen.

Tabelle 3. MS Ergebnisse Tandem-Affinitäts-Aufreinigung.

Probe	Protein	RefSeq Nummer	erwartetes MW (kDa)	IP (pH)	Score	Abdeckung (%)
Bande 1	Miz-1	NP_003434.1	90	6.00	300	44
Bande 2	Miz-1	NP_003434.1	90	6.00	123	22
Bande 3	zu wenig Material					
Bande 4	Miz-1	NP_003434.1	90	6.00	83	16
Bande 5	Hsp 70	NP_005336.2	70	5.42	129	28
Bande 6	zu wenig Material					

MW Molekulargewicht, IP Isoelektrischer Punkt

Neben Miz-1 konnte ein weiteres Protein koeluiert werden: Das Chaperon Heat shock protein 70 kDa (Hsp70). Hsp70 ist ein Polypeptid mit einem isoelektrischen Punkt von 5.42 und einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa (siehe Tabelle 3). Die Höhe, auf der die zugehörige Bande verläuft, entspricht etwa dieser Größe. Mit einer Mowse-Punktzahl (s. 2.2.5.4) von 129 ist eine relative hohe Sicherheit gegeben, dass es sich bei dem Protein um Hsp70 und nicht um ein anderes Polypeptid handelt. Die identifizierten Peptide decken die Peptidsequenz von Hsp70 zu 28% ab.

3.1.5 Miz-1 erscheint in drei Banden unterschiedlichen Molekulargewichts

Wie beschrieben, wurden sechs Banden aus dem SDS-Gel der TAP-Aufreinigung (Abbildung 12) massenspektrometrisch bestimmt. Drei dieser Banden konnten als Miz-1 identifiziert werden (Tabelle 3). Die Peptidsequenz von Miz-1 läßt eine Bande bei 90 kDa erwarten. Erfahrungsgemäß läuft die Bande aber bei einer Größe von etwa 100 kDa. Die im TAP-Ansatz identifizierten Miz-1 Banden laufen alle zwischen 98 kDa und 150 kDa des Größenmarkers. Bei Experimenten mit dem 10E2-anti-Miz-1-Antikörper zeigte sich ebenfalls ein Bandentriplett bei unterschiedlichen Molekulargewichten (siehe z. B. Staller *et al.* ¹⁹³).

Die verschiedenen Banden zeigen eine unterschiedliche Zusammensetzung der durch die Massenspektroskopie identifizierten Peptide (Abbildung 13).

Während die größte Bande 1 auch die größte Abdeckung (44%) aufweist, wurden bei den kleineren Banden 2 und 3 mit 22% bzw. 16% geringere Abdeckungsanteile ermittelt.

3.1.6 Zusammenfassung Tandem-Affinitäts-Aufreinigung

Mit dem Ziel, Miz-1 bindende Proteine zu identifizieren, wurde eine Tandem-Affinitäts-Aufreinigungstrategie etabliert. Das Miz-1-TAP Fusionsprotein zeigt gleiche Eigenschaften wie das Miz-1 wt Protein. Nach Überexpression des Fusionsproteins gelang die Aufreinigung und Identifizierung von Miz-1. Zudem konnte mit dem Chaperon Hsp70 ein neuer potentieller Interaktionspartner von Miz-1 identifiziert werden. Miz-1 selbst wurde in drei SDS-Gel-Banden mit unterschiedlichen Molekulargewichtsniveaus detektiert.

Ergebnisse

1	MDFPQHSQHV	LEQLNQQRQL	GLLCDCTFVV	DGVHFKAHKA	VLAACSEYFK
51	MLFVDQKDVV	HLDISNAAGL	GQVLEFMYTA	KLSLSPENVD	DVLAVATFLQ
101	MQDIITACHA	LK SLAEPATS	PGGNAEALAT	EGGDKRAKEE	KVATSTLSRL
151	EQAGR STPIG	PSRDLKEERG	GQAQSAASGA	EQTEKADAPR	EPPPVELKPD
201	PTSGMAAAEA	EAALSESSEQ	EMEVEPARKG	EEEQKEQEEQ	EEEGAGPAEV
251	KEEGSQLENG	EAP EENENE	SAGTDSGQEL	GSEARGLRSG	TYGDRTESKA
301	YGSVIHKCED	CGKE FTHTGN	FKRHIR IHTG	EKPFSCRECS	KAFSDPAACK
351	AHEK THSPLK	PYGCEECGKS	YR LISLLNLH	KKRHSGEARY	RCEDCGKLFT
401	TSGNLKRHQL	VHSGEKPYQC	DYCGRSFSDP	TSKMRHLETH	DTDKEHKCPH
451	CDKK FNQVGN	LKAHLK IHIA	DG PLK CRECG	K QFTTSGNLK	RHLRIHSGEK
501	PYVCIHCQRQ	FADPGALQRH	VRIHTG EKPC	QCVMCGKAFT	QASSLIAHVR
551	QHTGEKPYVC	ERCCKRFVQS	SQLANHIRHH	DNIRPHKCSV	CSKAFVNVGD
601	LSK HIIIHTG	EKPYLCDKCG	RGFNRVDNLR	SHVKTVHQGK	AGIKILEPEE
651	GSEVSVVTVD	DMVTLATEAL	AATAVTQLTV	VPVGAAVTAD	ETEVLKAEIS
701	KAVKQVQEEED	PNTHILYACD	SCGDK FLDAN	SLAQHVRIHT	AQALVMFQTD
751	ADFYQQYGPG	GTWPAGQVLQ	AGELVFRPRD	GAEGQPALAE	TSPTAPECPP
801	P	A	E		
1	MDFPQHSQHV	LEQLNQQRQL	GLLCDCTFVV	DGVHFKAHKA	VLAACSEYFK
51	MLFVDQKDVV	HLDISNAAGL	GQVLEFMYTA	KLSLSPENVD	DVLAVATFLQ
101	MQDIITACHA	LK SLAEPATS	PGGNAEALAT	EGGDKRAKEE	KVATSTLSRL
151	EQAGR STPIG	PSRDLKEERG	GQAQSAASGA	EQTEKADAPR	EPPPVELKPD
201	PTSGMAAAEA	EAALSESSEQ	EMEVEPARKG	EEEQKEQEEQ	EEEGAGPAEV
251	KEEGSQLENG	EAP EENENE	SAGTDSGQEL	GSEARGLRSG	TYGDRTESKA
301	YGSVIHKCED	CGKE FTHTGN	FKRHIR IHTG	EKPFSCRECS	KAFSDPAACK
351	AHEK THSPLK	PYGCEECGKS	YR LISLLNLH	KKRHSGEARY	RCEDCGKLFT
401	TSGNLKRHQL	VHSGEKPYQC	DYCGRSFSDP	TSKMRHLETH	DTDKEHKCPH
451	CDKK FNQVGN	LKAHLK IHIA	DG PLK CRECG	K QFTTSGNLK	RHLRIHSGEK
501	PYVCIHCQRQ	FADPGALQRH	VRIHTG EKPC	QCVMCGKAFT	QASSLIAHVR
551	QHTGEKPYVC	ERCCKRFVQS	SQLANHIRHH	DNIRPHKCSV	CSKAFVNVGD
601	LSK HIIIHTG	EKPYLCDKCG	RGFNRVDNLR	SHVKTVHQGK	AGIKILEPEE
651	GSEVSVVTVD	DMVTLATEAL	AATAVTQLTV	VPVGAAVTAD	ETEVLKAEIS
701	KAVKQVQEEED	PNTHILYACD	SCGDK FLDAN	SLAQHVRIHT	AQALVMFQTD
751	ADFYQQYGPG	GTWPAGQVLQ	AGELVFRPRD	GAEGQPALAE	TSPTAPECPP
801	P	A	E		
1	MDFPQHSQHV	LEQLNQQRQL	GLLCDCTFVV	DGVHFKAHKA	VLAACSEYFK
51	MLFVDQK DVV	HLDISNAAGL	GQVLEFMYTA	KLSLSPENVD	DVLAVATFLQ
101	MQDIITACHA	LKSLAEPATS	PGGNAEALAT	EGGDKRAKEE	KVATSTLSRL
151	EQAGR STPIG	PSRDLK EERG	GQAQSAASGA	EQTEKADAPR	EPPPVELKPD
201	PTSGMAAAEA	EAALSESSEQ	EMEVEPARKG	EEEQKEQEEQ	EEEGAGPAEV
251	KEEGSQLENG	EAP EENENE	SAGTDSGQEL	GSEARGLRSG	TYGDRTESKA
301	YGSVIHKCED	CGKE FTHTGN	FKRHIR IHTG	EKPFSCRECS	KAFSDPAACK
351	AHEK THSPLK	PYGCEECGKS	YR LISLLNLH	KKRHSGEARY	RCEDCGKLFT
401	TSGNLKRHQL	VHSGEKPYQC	DYCGRSFSDP	TSKMRHLETH	DTDKEHKCPH
451	CDKK FNQVGN	LKAHLK IHIA	DG PLK CRECG	K QFTTSGNLK	RHLRIHSGEK
501	PYVCIHCQRQ	FADPGALQRH	VRIHTG EKPC	QCVMCGKAFT	QASSLIAHVR
551	QHTGEKPYVC	ERCCKRFVQS	SQLANHIRHH	DNIRPHKCSV	CSKAFVNVGD
601	LSK HIIIHTG	EKPYLCDKCG	RGFNRVDNLR	SHVKTVHQGK	AGIKILEPEE
651	GSEVSVVTVD	DMVTLATEAL	AATAVTQLTV	VPVGAAVTAD	ETEVLKAEIS
701	KAVKQVQEEED	PNTHILYACD	SCGDK FLDAN	SLAQHVRIHT	AQALVMFQTD
751	ADFYQQYGPG	GTWPAGQVLQ	AGELVFRPRD	GAEGQPALAE	TSPTAPECPP
801	P	A	E		

Abbildung 13: Durch Massenspektrometrie identifizierte Peptide der drei unterschiedlich großen Miz-1 Banden aus der TAP Aufreinigung. Aus jeder der drei Banden wurden unterschiedliche Peptide (rot) detektiert.

3.2 Fraktionierung und LC-MS/MS

Mit der Kopplung der Flüssigchromatographie und der Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) ist es möglich, die Zusammensetzung von komplexen Proteingemischen direkt zu identifizieren. Schätzungen zufolge gibt es im Gesamtzelllysat einer eukaryotischen Zelle bis zu 5×10^4 unterschiedliche Proteine²⁶⁹. Bei der Identifikation des kompletten Proteoms einer Zelle werden im ersten Schritt einer LC-MS die Proteine mit Endopeptidasen (z. B. mit Trypsin) gespalten. Dies erhöht die Komplexität des Peptidgemisches auf etwa 2×10^6 Peptide für die LC-MS (Übersicht siehe Fröhlich & Arnold²⁷⁰). Um diese Komplexität zu verringern und um Komplexe mit c-Myc bzw. Miz-1 anzureichern, wurde zunächst im analytischen Maßstab ein Fraktionierungsschema entwickelt, aus dem die Etablierung eines präparativen Ansatzes folgte. Aus dem präparativen Ansatz wurden dann die Fraktionen gewonnen, die Kandidatenkomplexe mit c-Myc und Miz-1 enthielten. Ausgewählte Fraktionen wurden einer LC-MS zugeführt.

3.2.1 Etablierung des Anreicherungschemas

Am Ende der hier durchgeführten Fraktionierung sollten in einzelnen Fraktionen Proteinkomplexgemische angereichert und soweit von Kontaminanten befreit sein, dass eine direkte massenspektrometrische Untersuchung des Proteingemischs in der jeweiligen Fraktion möglich ist. Die identifizierten Polypeptide stellen potentielle Interaktionspartner von c-Myc und/oder Miz-1 und Untereinheiten größerer gemeinsamer Multiproteinkomplexe dar. Um Fraktionen mit ausreichend großen Mengen an Proteinkomplexen der Massenspektrometrie zuführen zu können, wurde zunächst eine Anreicherungsstrategie für Komplexe, die Miz-1 und c-Myc enthalten, etabliert^{46, 271}. Das etablierte Anreicherungschema für analytische Proteinmengen ist in Abbildung 14 dargestellt.

Ergebnisse

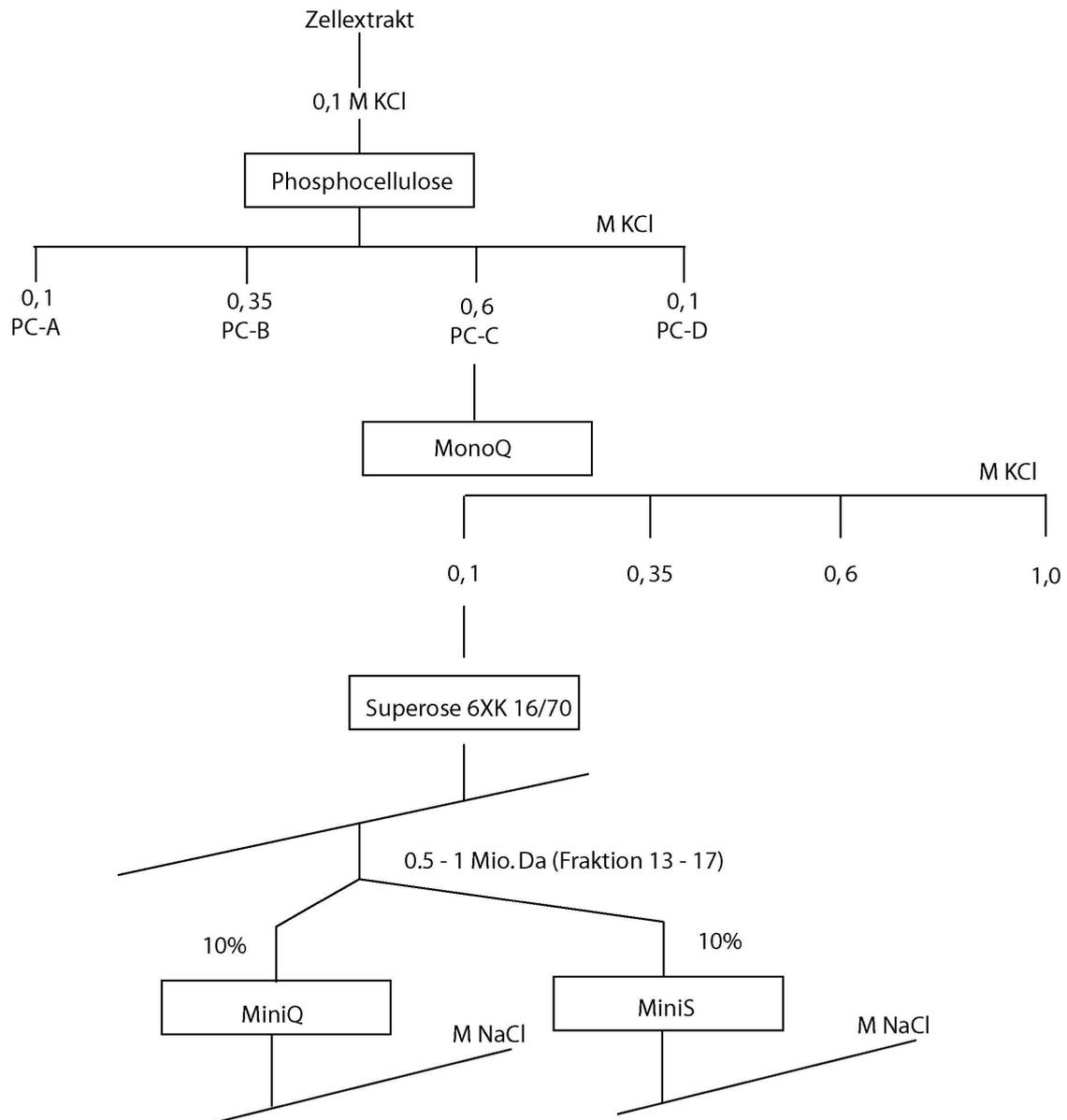


Abbildung 14. Analytisches Fraktionierungsschema.

3.2.2 Miz-1 und c-Myc eluieren gemeinsam in der PC-C Fraktion

In Vorbereitung auf die Fraktionierung wurden HEK293T Zellen in Suspensionskultur angezogen. Aus diesen Zellen wurde sowohl ein cytoplasmatischer Extrakt (S100) als auch ein Kernlysat hergestellt. Für den ersten Fraktionierungsschritt wurde eine Kationenaustauscher-Säule mit an Cellulose immobilisierten Phosphatgruppen (Phosphocellulose) verwendet. Entsprechend der Beladungskapazität der jeweiligen Säulen wurden Kernextrakte aus HEK293T Zellen in 100 mM Kaliumchlorid (KCl) auf die Säule aufgetragen.

Die Durchbruchfraktion der Phosphocellulose Säule (=PC-A) enthält alle Proteine, die nicht an die Säulenmatrix binden. Durch die schrittweise Elution mit 350 mM KCl, 600 mM KCl und 1M KCl wurden drei weitere Fraktionen gesammelt und als PC-B, PC-C und PC-D bezeichnet. Die Western Blot Analyse (Abbildung 15) zeigt die Verteilung von c-Myc und Miz-1 in den Phosphocellulose-Fractionen. Im Vergleich zum cytoplasmatischen Extrakt (S100) und zur Durchbruchfraktion wird Miz-1, bei identischen Proteinmengen, in der PC-C Fraktion stark angereichert (vgl. Bahnen S100, PC-A und PC-C, PC-D ist nicht dargestellt). Die Proteinkonzentration von c-Myc ist sowohl in PC-B als auch PC-C im Vergleich zu Miz-1 gering. Da ein Hauptziel der Fraktionierung die Identifizierung eines möglichen Miz-1/c-Myc Komplexes ist, wurde allein die PC-C Fraktion weiter bearbeitet. Im folgenden Schritt wurde die PC-C Fraktion auf eine MonoQ Säule (Anionentauscher) aufgetragen und die gesammelten Fraktionen anschließend mittels Western Blot analysiert. Abbildung 15 zeigt die beiden Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen an c-Myc und Miz-1 (MonoQ 0.1-0.35 M KCl und MonoQ 0.35-0.6 M KCl). Für die nachfolgende Größenfraktionierung wurde aufgrund der höchsten Konzentrationen an c-Myc und Miz-1 die Fraktion MonoQ 0.1-0.35 M KCl weiterverwendet.

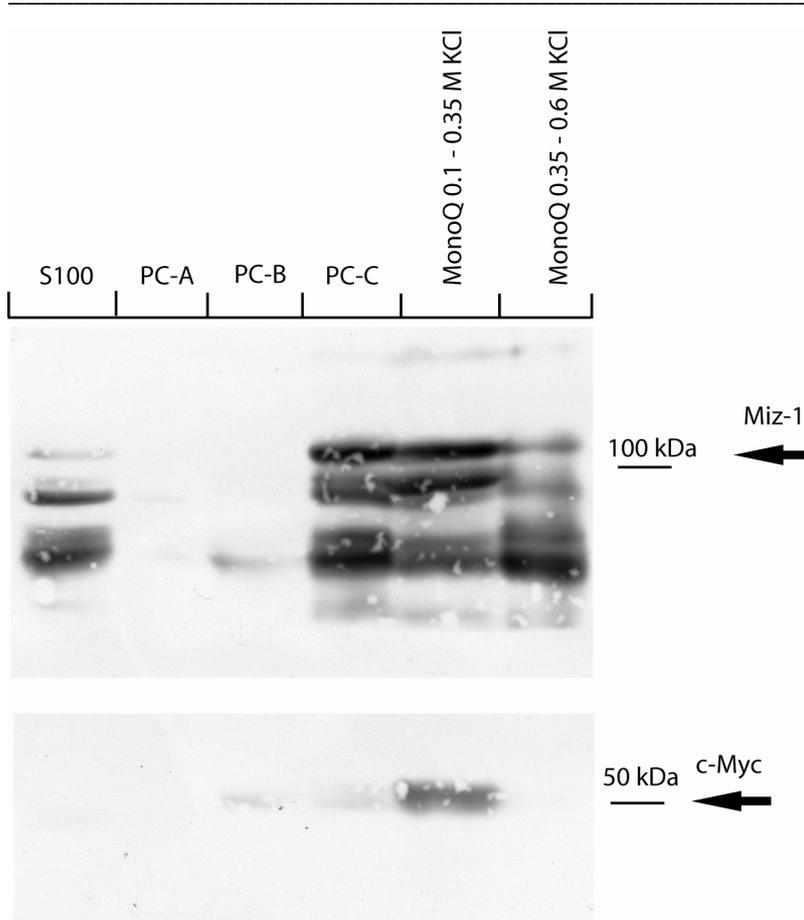


Abbildung 15. Phosphocellulose- und MonoQ-Chromatographie. Western Blot gegen Miz-1 (oben) und c-Myc (unten). Die Bahn S100 stellt das cytoplasmatische Lysat aus HEK293T Zellen dar. PC-A ist die Durchbruchsfraction des Kernlysats der Phosphocellulose Säule. PC-B und PC-C sind die 350 mM bzw. 600 mM KCl Elutionsfraktionen der Phosphocellulose Säule. Rechts sind die MonoQ Fraktionen MonoQ 0.1-0.35 M KCl und MonoQ 0.35-0.6M KCl dargestellt. Die Hauptproteinmengen von Miz-1 und c-Myc finden sich in der PC-C Fraktion sowie in der MonoQ 0.1-0.35 M KCl Fraktion.

3.3 Miz-1 tritt in Komplexen auf

Um zu untersuchen, ob Miz-1 tatsächlich durch die Fraktionierung in größeren Multiproteinkomplexen angereichert werden konnte, wurde eine analytische Superose 6 Größenfraktionierung durchgeführt. Abbildung 16 zeigt die Verteilung von Miz-1 auf die Fraktionen, in denen Proteine oder Proteinkomplexe verschiedener Molekulargewichte auftreten. Als Kontrollen wurden der cytoplasmatische Extrakt (S100), die PC-C Fraktion und die MonoQ Fraktion 0.1-0.35 M KCL aufgetragen. Miz-1 tritt in Fraktionen auf, die Komplexe einer Partikelgröße von über 600 kDa darstellen. Zur Größenbestimmung wurden Eichungen mit externen Größenstandards auf der gleichen Säule durchgeführt (s. 2.2.5.3).

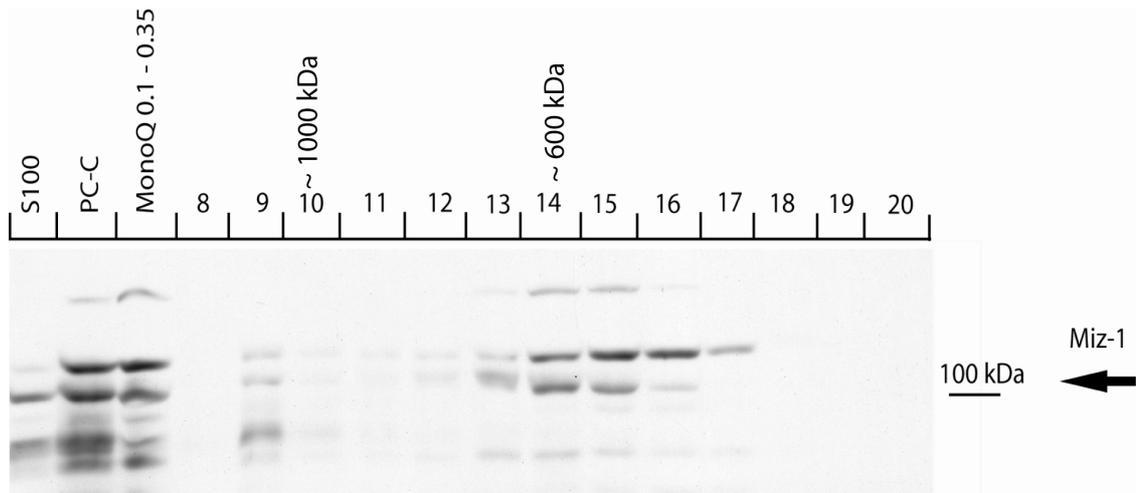


Abbildung 16. Analytische Größenfraktionierung. Western Blot gegen Miz-1 in einer Superose 6 Größenfraktionierung. Kontrollen: S100 Ausgangsextrakt, Phosphocellulose Fraktion PC-C, Fraktion der MonoQ Säule 0.1–0.35 M KCl. Die Fraktionen 8-20 stellen die Fraktionierung mittels Superose 6 dar. Miz -1 eluiert in den Fraktionen 13–17, ist aber auch in Fraktion 9 detektierbar. Die Fraktionen 13-17 wurden mit MiniQ und MiniS Säulen weiter analysiert. c-Myc wurde nur in der präparativen Größenfraktionierung untersucht (siehe Abbildung 20).

3.3.1 Elutionsverhalten von Miz-1 und c-Myc mit MiniS und MiniQ Säulen

Um eine weitere Anreicherung c-Myc und Miz-1 -haltiger Proteinkomplexe zu erzielen, wurden die aus der Größenfraktionierung gewonnenen Fraktionen mit Proteinkomplexen höheren Molekulargewichts vereinigt und jeweils 10% auf eine MiniS bzw. MiniQ Säule aufgetragen.

Wie aus Abbildung 17 hervorgeht, eluieren die größten Mengen an c-Myc und Miz-1 in unterschiedlichen Fraktionen (c-Myc: Fraktion 6; Miz-1: Fraktion 8) der analytischen MiniS Fraktionierung. Daher muss davon ausgegangen werden, dass nur ein Teil des bis dahin angereicherten c-Myc bzw. Miz-1 im gleichen Komplex vorhanden sein kann. Der größere Teil beider Proteine liegt vermutlich in Komplexen mit anderen Interaktionspartnern vor. Als mögliche Ursache muss hier auch die Dissoziation des c-Myc/Miz-1 Komplexes unter den Salzbedingungen der Säulen diskutiert werden. Beide Komponenten finden sich aber auch in gleichen Fraktionen, wie z. B. Fraktion 8 zeigt.

Ein ähnliches Bild ergab die analytische MiniQ Fraktionierung (Abbildung 18). Auch hier finden sich die höchsten Konzentrationen an c-Myc und Miz-1 in verschiedenen Fraktionen (c-Myc: Fraktion 6; Miz-1: Fraktion 4 und 5).

Aus den gewonnenen Erkenntnissen der analytischen MiniS und MiniQ Fraktionierungen leitete sich die Strategie für die präparative Reinigung ab: nach der Größenfraktionierung eine hintereinander geschaltete Fraktionierung, erst MonoQ, dann MonoS, durchzuführen. Auf der einen Seite führt diese Strategie zwar zum Verlust von c-Myc und Miz-1 für die Massenspektrometrie, auf der anderen Seite kann so aber die Menge an Proteinen vermindert werden, die nicht an c-Myc oder Miz-1 binden.

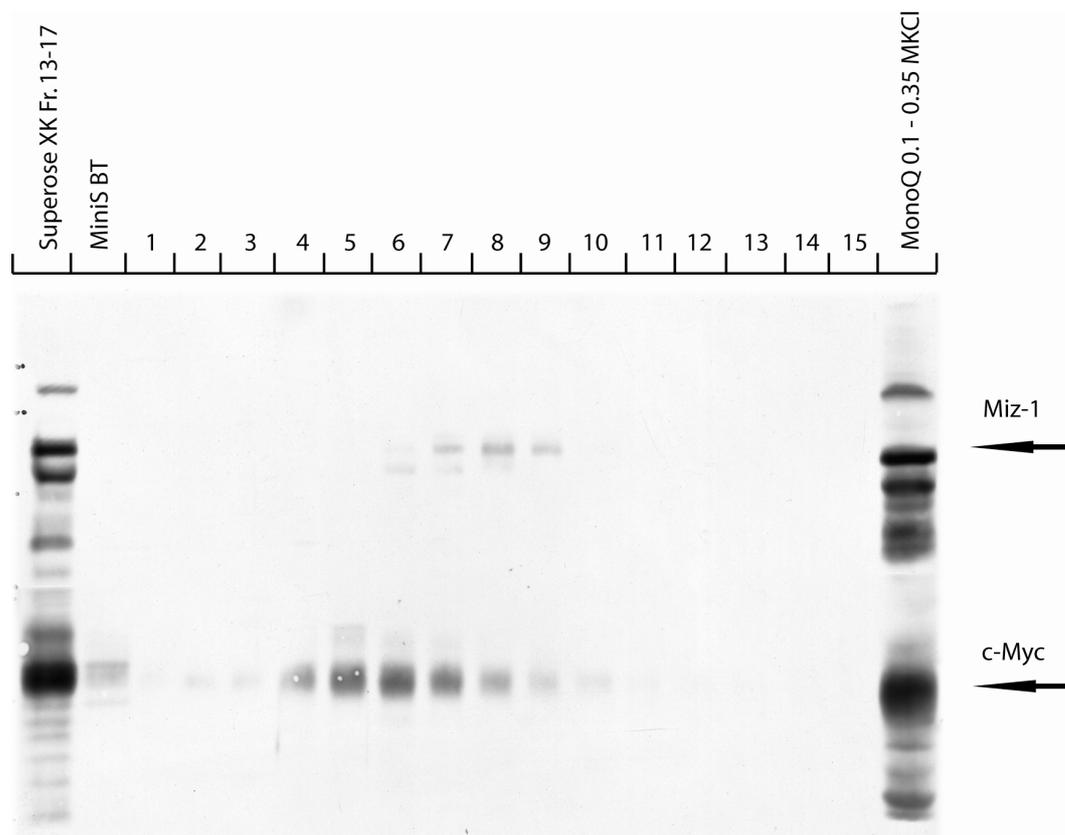


Abbildung 17 Unterschiedliche Elutionsprofile von c-Myc und Miz-1 in der analytischen MiniS Chromatographie. 10% der vereinigten Superose 6 Fraktionen 13-17 wurden auf eine analytische MiniS Säule aufgetragen. Die Abbildung zeigt einen Western Blot gegen Miz-1 (oberer Pfeil) und c-Myc (unterer Pfeil). Es wurden je 5 µl Eluat aufgetragen. Die größte Menge an c-Myc wurde in den Fraktionen 5 und 6 detektiert; die größte Menge an Miz-1 fand sich in der Fraktion 8. MiniS BT: Durchbruchfraktion. Die unterschiedlichen Elutionsprofile zeigen, dass Miz-1 und c-Myc nur zum Teil in denselben Fraktionen und somit im selben Komplex zu finden sind. Der erheblich größere Teil beider Proteine ist nicht an den untersuchten Partner gebunden.

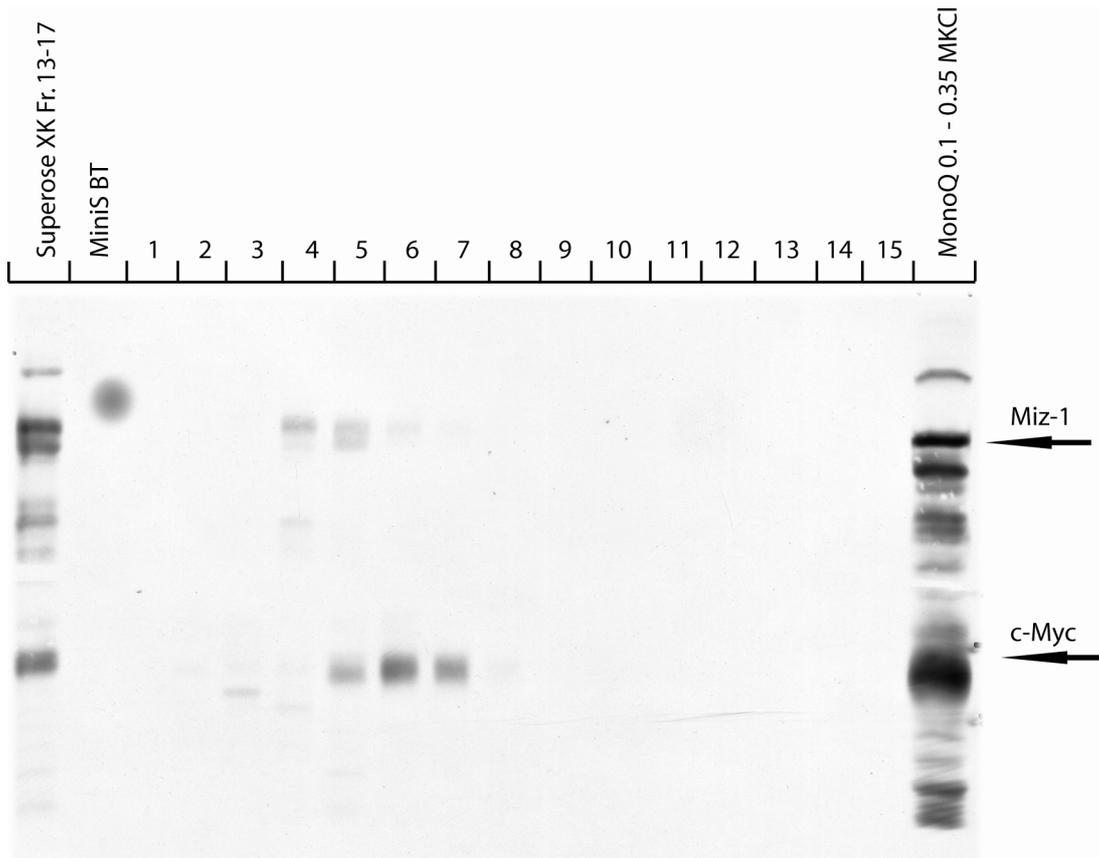


Abbildung 18 Unterschiedliche Elutionsprofile von c-Myc und Miz-1 in der analytischen MiniQ Chromatographie. 10% der vereinigten Superose 6 Fraktionen 13-17 wurden auf eine analytische MiniQ Säule aufgetragen. Die Abbildung zeigt einen Western Blot gegen Miz-1 (oberer Pfeil) und c-Myc (unterer Pfeil). Es wurden je 5 μ l Eluat aufgetragen. Die größte Menge c-Myc wurde in der Fraktion 6 detektiert; die größte Menge Miz-1 fand sich in den Fraktionen 4 und 5.

3.3.2 Präparatives Fraktionierungsschema

Für den präparativen Ansatz der Fraktionierung wurde, wie schon im analytischen Ansatz, die MonoQ 0.1-0.35M KCl Fraktion verwendet. In der präparativen Superose 6 Größenfraktionierung zeigte sich, dass sowohl c-Myc als auch Miz-1 in Fraktionen mit Partikeln größer als 600 kDa, also in Multiproteinkomplexen, vorkommen (Abbildung 19). Für c-Myc zeigte sich, dass seine höchste Konzentration in den Fraktionen mit 600-1.000 kDa vorliegt. Die Größenfraktionierung belegt, dass sowohl Miz-1 als auch c-Myc in Proteinkomplexen mit einer Größe von etwa 1 Mio Dalton enthalten sind. Diese Fraktionen (6-10 in Abbildung 20) wurden vereinigt und mittels einer präparativen MonoQ Chromatographie weiter verarbeitet (Abbildung 21).

Ergebnisse

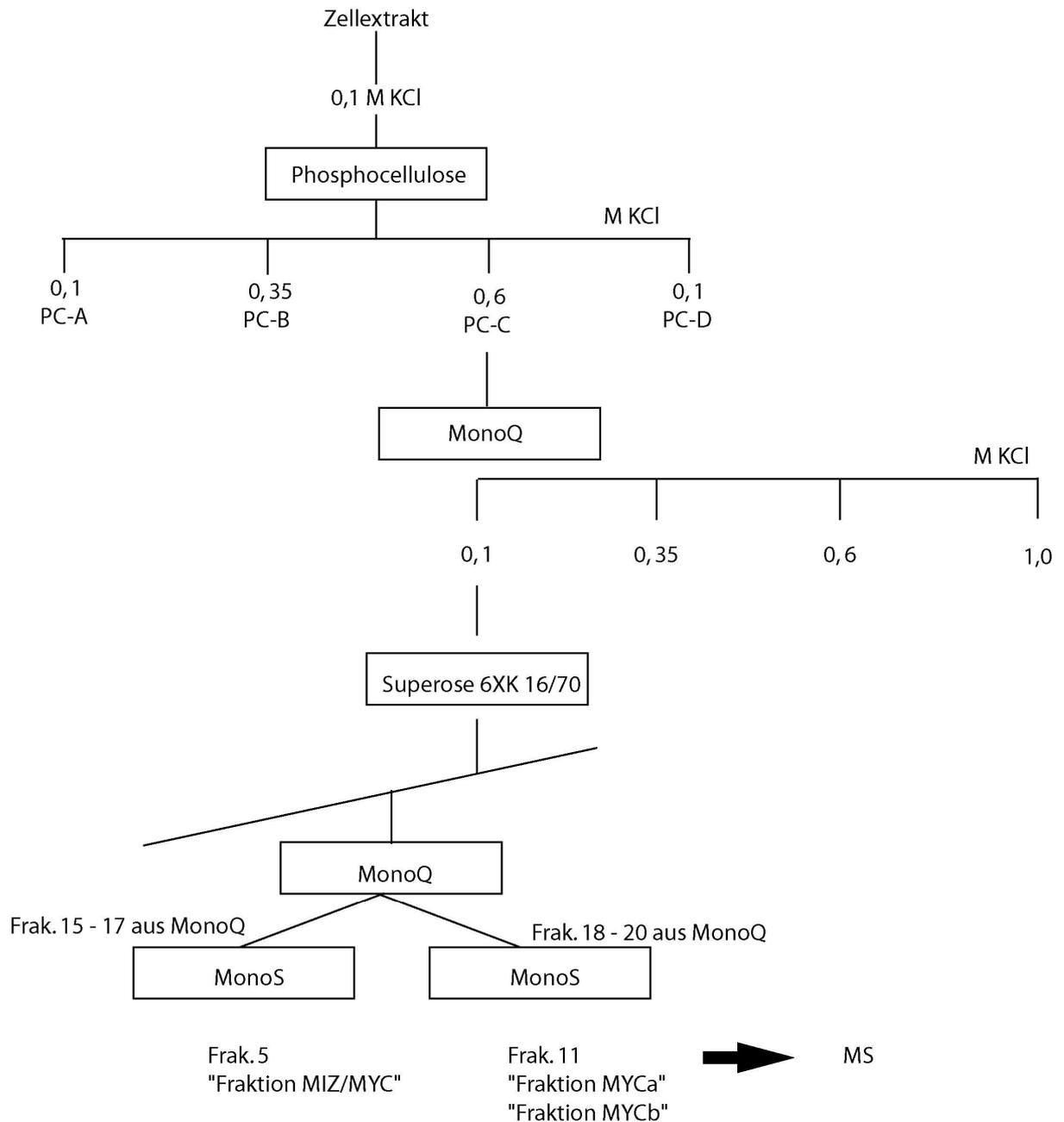


Abbildung 19. Präparatives Fraktionierungsschema. Im Gegensatz zur analytischen Fraktionierung wurden nach der Superose 6 Größenfraktionierung keine sequentiellen Chromatographien mit Ionenaustauschersäulen durchgeführt. In der präparativen Größenfraktionierung sind sowohl c-Myc als auch Miz-1 in Fraktionen detektierbar, die Komplexe mit Molekulargewichten größer als 600 kDa darstellen.

Ergebnisse

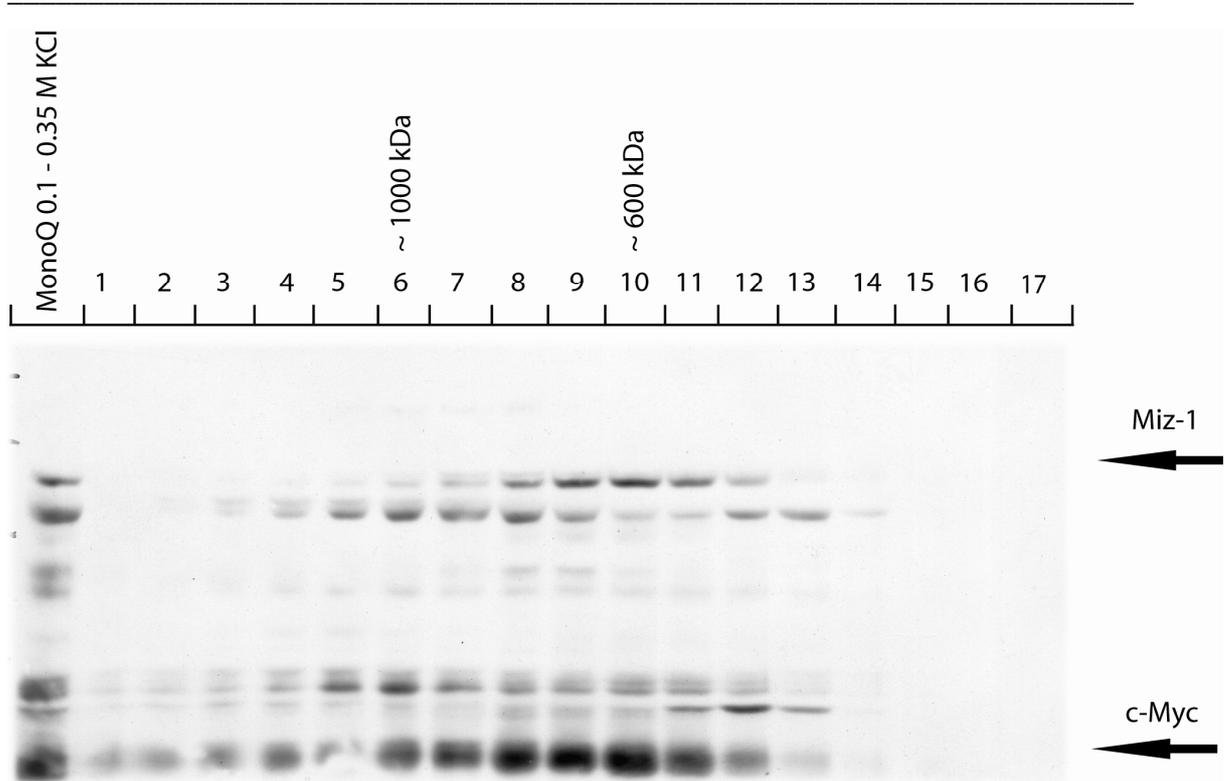


Abbildung 20. Präparative Größenfraktionierung. Western Blot gegen Miz-1 (oben) und c-Myc (unten). Das Miz-1 und c-Myc enthaltende MonoQ 0.1–0.35 M KCl Eluat wurde einer Superose 6 Größenfraktionierung unterzogen. Die Bahnen 6–10 wurden vereinigt und der präparativen MonoQ Fraktionierung zugeführt. Die Größen wurden anhand von Größenstandards geschätzt (siehe 2.2.5.3).

3.3.3 Unterschiedliche Fraktionen für die LC-MS/MS

Wie schon im analytischen Fraktionierungsansatz wurden die c-Myc und Miz-1 haltigen Fraktionen aus der Größenfraktionierung vereinigt und einer Anionenaustauscher- bzw. einer Kationenaustauscher-Chromatographie zugeführt. Im Gegensatz zum analytischen Ansatz erfolgte dies jedoch nicht parallel, sondern hintereinandergeschaltet und die verwendeten Chromatographiematerialien waren MonoQ statt MiniQ bzw. MonoS statt MiniS. Nach der MonoQ Anionenaustauscher-Chromatographie wurden je drei MonoQ Fraktionen vereinigt: die Fraktionen 15-17 und die Fraktionen 18-20. Dies erfolgte zum einen auf Grund des zu großen Volumens aller 6 Fraktionen, zum anderen, um die Wahrscheinlichkeit einer Auftrennung verschiedener Komplexe mit der MonoS Säule zu erhöhen.

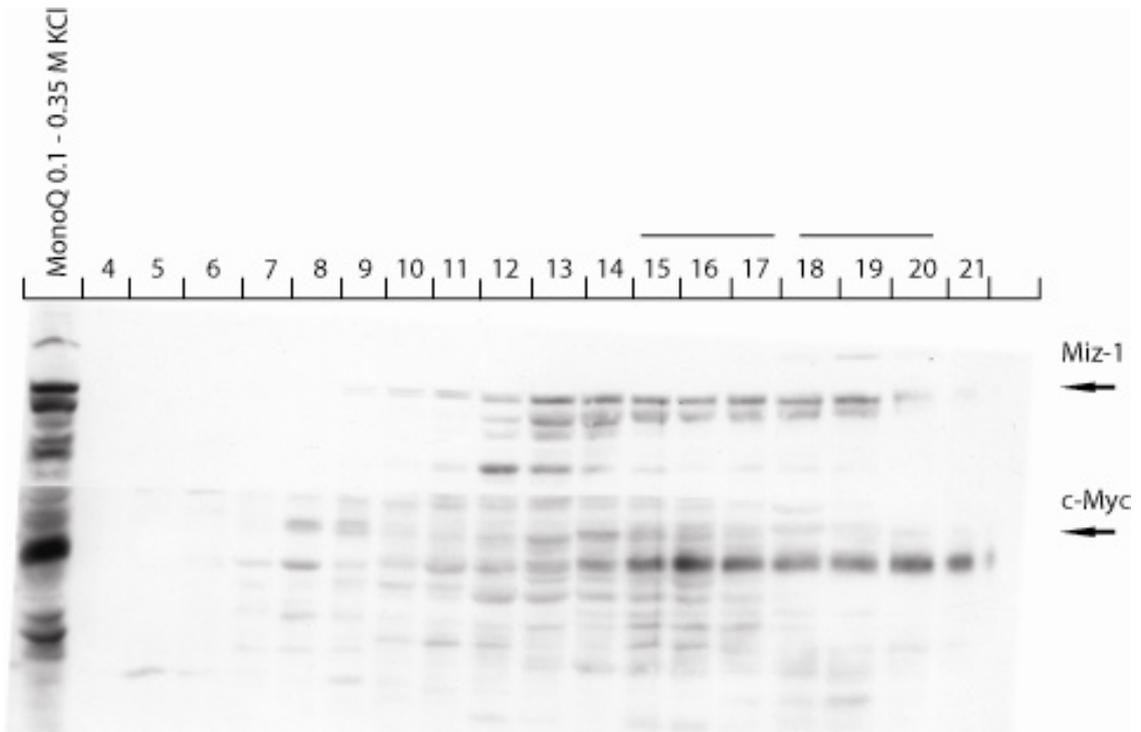


Abbildung 21. Präparative MonoQ Fraktionierung. Western Blot Analyse der MonoQ Fraktionierung aus der Superose 6 Größenfraktionierung. Fraktionen, die viel Miz-1 enthielten, wurden auf die MonoQ Säule aufgetragen (Sup. Frakt 13-17). Die MonoQ Fraktionen 13–19 enthielten den größten Anteil Miz-1. In den Fraktionen 15–20 wurde die größte Menge an c-Myc detektiert. Die Fraktionen 15-17 und 18-20 wurden jeweils zusammengefasst und mittels einer MonoS Säule erneut fraktioniert (siehe Abbildung 22).

Tatsächlich zeigten die vereinigten Proben unterschiedliche Elutionsprofile in der MonoS Chromatographie (Abbildung 22). In der linken Hälfte des Blots erkennt man, dass die Menge von c-Myc und Miz-1 in den Fraktionen 4, 5 und 6 am stärksten ist. In der rechten Hälfte trennen sich die Konzentrationsspitzen von c-Myc (Fraktion 11) und Miz-1 (Fraktion 14) auf. Das deutet auf mögliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Proteine und Komplexe in den Fraktionen hin.

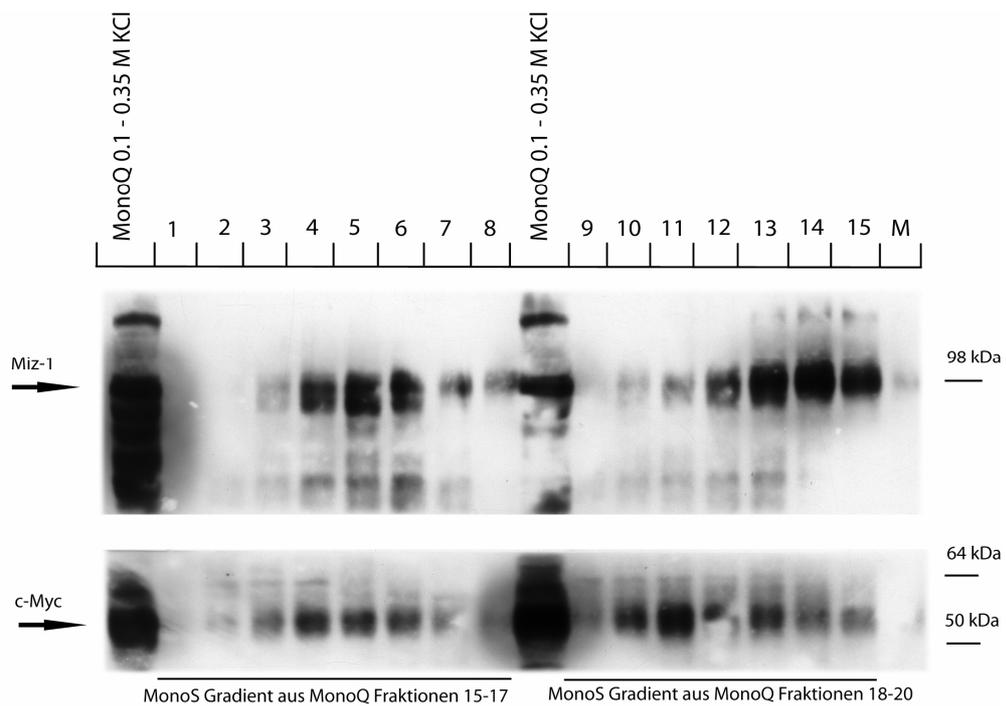


Abbildung 22 . MonoS Fraktionen für die LC-MS. Western Blot Analyse eines MonoS Gradienten aus den Fraktionen 15-17 und den Fraktionen 18-20 des MonoQ Gradienten (Abbildung 21) mit anti-Miz-1 (oben) bzw. anti-c-Myc (unten) Antikörpern. 10% SDS-Trenngel, aufgetragen je 10 μ l einer Fraktion. Bahn 18: Marker. Bahn 1 und 10: je 5 μ l der MonoQ 0.1-0.35 KCl Fraktion. Die zugehörigen Fraktionen zu den Bahnen 5 (MIZ/MYC) und 11 (MYC/a,b) wurden zur massenspektroskopischen Analyse weiterverwendet.

3.4 Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchungen

Aus den präparativen MonoS Fraktionen wurden zwei Fraktionen für die LC-MS/MS ausgewählt (Fraktion 5 und Fraktion 11 siehe Abbildung 22).

Eine einzelne Probe der Fraktion Nr. 5 des MonoS Gradienten aus den MonoQ Fraktionen 15-17 und zwei identische Proben der Fraktion Nr. 11 aus den MonoQ Fraktionen 18-20 wurden in der massenspektrometrischen Untersuchung mittels LC-ESI-MS/MS (liquid chromatography-electrospray ionization - MS) analysiert. Die LC-ESI-MS/MS wurde von A. Bosserhoff im Labor von T. Ruppert in Heidelberg durchgeführt. TCA-präzipitierte Proteine aus den Fraktionen wurden mit Endopeptidasen gespalten und durch die Massenspektrometrie identifiziert. Die Auswertung erfolgte mit der Software MASCOT® (<http://www.matrixscience.com/>). In die Auswertung aufgenommen wurden nur solche Proteine, deren Mowse- Score anzeigte, dass sich die Massen der identifizierten Peptide nicht signifikant ($p < 0,05$) von den erwarteten Massenzahlen in der Mascot Datenbank unterscheiden.

Die analysierte Probe der Fraktion Nr. 5 (nachfolgend Fraktion MIZ/MYC) enthielt zu etwa gleichen Teilen c-Myc und Miz-1 (Abbildung 22). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 5 dargestellt. In den beiden Proben der Fraktion Nr. 11 (nachfolgend MYC/a, MYC/b) fanden sich vergleichsweise geringe Mengen Miz-1, dafür aber ein hoher Anteil c-Myc. Die identifizierten Proteine dieser Fraktionen sind in Tabelle 4 dargestellt. Insgesamt konnten 171 unterschiedliche Proteine identifiziert werden.

Die identifizierten Proteine wurden methodisch in vier Gruppen eingeteilt:

- 1) Proteine, die in allen drei Proben identifiziert wurden: 12 Proteine: Chd4, Chd5, erythropoietin 4 immediate early response, DHX16, SnrpD1, SnrpA, SnrpG, Kif3A, eukaryotic translation initiation factor S 1 & 2, ANKHD1 und KIAA1984
- 2) Proteine, die in beiden Proben der Fraktion Nr. 5 enthalten waren (MYC/a und MYC/b): 31 Proteine
- 3) Proteine die entweder in MYC/a oder MYC/b und in MIZ/MYC identifiziert wurden: 27 Proteine
- 4) Proteine die nur in jeweils einer der drei Proben identifiziert wurden: MYC/a (20 Proteine); MYC/b (32 Proteine), MIZ/MYC (88 Proteine).

Aus den identischen Fraktionen MYC/a und MYC/b wurden 82 unterschiedliche Proteine identifiziert. Von diesen 82 Proteinen konnten nur 31 (38%) in beiden Fraktionen nachgewiesen werden.

Die identifizierten Proteine wurden ihrer Funktion nach in Untergruppen klassifiziert. So fanden sich in allen Fraktionen auffällig viele Proteine, die mit der Translationsinitiation in Zusammenhang stehen. Eine weitere Gruppe von Proteinen stellten Untereinheiten des Exosoms dar, das am Metabolismus, speziell am Abbau von mRNA, beteiligt ist. Eine dritte (verwandte) Gruppe von Proteinen ist an der Prozessierung der mRNA beteiligt, wie z. B. Komponenten des Spliceosoms. Andere Proteine gehören zu Komplexen, die direkt mit der Regulation der Transkription assoziiert und an der Organisation des Chromatins beteiligt sind. So fanden sich Untereinheiten der NURD und Swi/Snf – Komplexe, die durch Modifikation von Histonresten und Nukleosomen-Remodellierungen die Transkription regulieren können. Außerdem konnten Proteine identifiziert werden, die Untereinheiten oder Ko-Faktoren der RNA Polymerasen I-III darstellen.

Es konnten 17 bereits als Interaktionspartner von c-Myc beschriebene Proteine identifiziert werden (Tabelle 4 & 5, grün unterlegt, Vergleichs-Datenbank für Protein-Protein Interaktionen www.hrdb.com.)

Tabelle 4 und 5: Kandidatenproteine für eine Interaktion mit c-Myc bzw Miz-1. Ergebnisse der LC-MS/MS Untersuchung des Proteingemisches der Proben MYC/a und MYC/b und MIZ/MYC (siehe Text). a identifiziert in Probe MYC/a, b identifiziert in Probe MYC/b, ** identifiziert in Probe MYC/a oder Probe MYC/b und Probe MIZ/MYC, *** identifiziert in allen drei Proben. Die mit grüner Farbe unterlegten Proteine stellen bereits identifizierte Interaktionspartner von c-Myc (Quelle: www.hprd.com) dar.

Lfd. Nr.	Probe	Protein ID, Gen Symbol	Protein Name	Funktion
1	a,b	NP_001264, CHD4	Chromodomain helicase DNA binding protein 4***	Chromatin/Transkription
2	a,b	NP_056372, CHD5	Chromodomain helicase DNA binding protein 5***	Chromatin/Transkription
3	a,b	NP_001511, GTFIIIC1	general transcription factor IIIC, polypeptide 1, alpha 220kDa	Chromatin/Transkription
4	a	NP_001512, GTFIIIC2	general transcription factor IIIC, polypeptide 2, beta 110kDa	Chromatin/Transkription
5	a	NP_036219, GTFIIIC5	general transcription factor IIIC, polypeptide 5, 63kDa	Chromatin/Transkription
6	b	NP_004955, HDAC1 NP_001518, HDAC2	histone deacetylase 1,2**	Chromatin/Transkription
7	b	NP_003917, MBD3	methyl-CpG binding domain protein 3**	Chromatin/Transkription
8	b	NP_008986, PolIII A	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide A, 155kDa	Chromatin/Transkription
9	a	NP_005601, RBB4	retinoblastoma binding protein 4**	Chromatin/Transkription
10	b	NP_004866, PolR1C	RNA polymerase I subunit isoform 2**	Chromatin/Transkription
11	a,b	NP_002676, EXOSC10	exosome component 10 isoform 2	Exosom
12	a	NP_055100, EXOSC2	exosome component 2**	Exosom
13	b	NP_055819, EXSC7	exosome component 7**	Exosom
14	b	NP_001029366, EXOCS9	exosome component 9 isoform 1	Exosom
15	b	NP_064543, EXOCS5	exosome component Rrp46; exosome component 5**	Exosom

Tabelle 4 fortgesetzt: Durch LC-MS identifizierte Kandidateninteraktoren von aus den Proben MYC/a und MYC/b				
Lfd. Nr.	Probe	Protein ID, Gen Symbol	Protein Name	Funktion
16	b	NP_478126, EXOCS6	homolog of yeast mRNA transport regulator 3, Exosome component 6	Exosom
17	b	NP_056175, SKIV2L2	superkiller viralicidic activity 2-like 2**	Exosom
18	b	NP_054733, ASCC3L	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	RNA Prozessierung
9	b	NP_008938, CPSF6	cleavage and polyadenylation specific factor 6, 68 kD subunit**	RNA Prozessierung
20	a	NP_004809, DDX23	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 23	RNA Prozessierung
21	a,b	NP_003578, DHX16	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 16***	RNA Prozessierung
22	b	NP_078888, DHX40	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40**	RNA Prozessierung
23	a,b	NP_056280, GEMIN5	gemin 5	RNA Prozessierung
24	a,b	NP_008869, SNRPD1	small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide 16kDa***	RNA Prozessierung
25	a,b	NP_004587, SNRPDA	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A***	RNA Prozessierung
26	a,b	NP_003082, SNRPDB	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide B/B' isoform B	RNA Prozessierung
27	a,b	NP_003084, SNRPDC	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide C	RNA Prozessierung
28	a,b	NP_004588, SNRPD2	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide D2	RNA Prozessierung
29	a,b	NP_003085, SNRPDE	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide E	RNA Prozessierung
30	b	XP_034623	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide E-like 1	RNA Prozessierung
31	a,b	NP_003087, SRPG	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G***	RNA Prozessierung
32	b	NP_006833, SF3B2	splicing factor 3b, subunit 2, 145kDa**	RNA Prozessierung
33	a,b	NP_005841, SF3B4	splicing factor 3b, subunit 4*	RNA Prozessierung
34	a,b	NP_003080, SNRP70	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa isoform a*	RNA Prozessierung

Tabelle 4 fortgesetzt: Durch LC-MS identifizierte Kandidateninteraktoren aus den Proben MYC/a und MYC/b				
Lfd. Nr.	Probe	Protein ID, Gen Symbol	Protein Name	Funktion
35	b	NP_055571, CKAP5	cytoskeleton associated protein 5	Struktur/Cytoskelett
36	a,b	NP_003861, IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1***	Struktur/Cytoskelett
37	a,b	NP_008985, KIF3A	kinesin family member 3A***	Struktur/Cytoskelett
38	a	NP_524149, MYL6	myosin light chain 3	Struktur/Cytoskelett
39	a	NP_002963, SBF1	SET binding factor 1 isoform a	Struktur/Cytoskelett
40	b	NP_116093, TUBA6	Tubulin isoform 6	Struktur/Cytoskelett
41	b	NP_821133, TUBB	tubulin, beta polypeptide	Struktur/Cytoskelett
42	a,b	NP_003899, EIF2S2	eukaryotic translation initiation factor 2 beta***	Translationsinitiation
43	a,b	NP_004085, EIF2S1	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa***	Translationsinitiation
44	a	NP_001406, EIF2S3	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma, 52kDa**	Translationsinitiation
45	a	NP_001405, EIF2B1	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 alpha, 26kDa	Translationsinitiation
46	a,b	NP_055054, EIF2B2	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 2 beta, 39kDa	Translationsinitiation
47	a,b	NP_065098, EIF2B3	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 3 gamma, 58kDa	Translationsinitiation
48	a	NP_056451, EIF2B4	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 4 delta	Translationsinitiation
49	b	NP_056451, EIF2B4	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 4 delta isoform 3	Translationsinitiation
50	a,b	NP_003898, EIF2B5	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 5 epsilon, 82 kDa	Translationsinitiation
51	a,b	NP_057175, EIF2B6	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6 interacting protein	Translationsinitiation
52	b	NP_003744, EIF3S7	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7	Translationsinitiation
53	b	NP_003741, EIF3S10	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 theta, 150/170kDa	Translationsinitiation

Tabelle 4 fortgesetzt: Durch LC-MS identifizierte Kandidateninteraktoren aus den Proben MYC/a und MYC/b				
Lfd. Nr.	Probe	Protein ID, Gen Symbol	Protein Name	Funktion
54	a,b	NP_003748, EIF3S2	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 beta, 36kDa	Translationsinitiation
55	b	NP_003745, EIF3S5	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon, 47 kDa**	Translationsinitiation
56	a	NP_003745, EIF3S5	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon, 52 kDa	Translationsinitiation
57	a,b	NP_001559, EIF3S6	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48kDa	Translationsinitiation
58	b	NP_003743; EIF3S8	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, 110kDa	Translationsinitiation
59	a,b	NP_003742, EIF3S9	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 9 eta, 116kDa	Translationsinitiation
60	a,b	NP_071349	ubiquitin-conjugating enzyme E2O	Ubiquitin „pathway“
61	a,b	NP_060217, ANKHD1	ankyrin repeat and KH domain containing 1 isoform 1***	Versch./Apoptose
62	b	NP_006351, GA17	B5 receptor	Verschiedene
63	b	NP_078994	C9orf86 protein	Verschiedene
64	b	NP_004633, Cdk2AP1	Cdk2-associated protein 1**	Verschiedene
65	a,b	NP_115963	dpy-30-like protein*	Verschiedene
66	a,b	NP_060941	erythropoietin 4 immediate early response***	Verschiedene
67	a		fusion protein	Verschiedene
68	a	NP_003995, GJB2	gap junction protein, beta 2, 26kDa (connexin 26)	Struktur/Cytoskelett
69	a	NP_006588, HspA8	heat shock 70kDa protein 8 isoform 1**	Proteinfaltung
70	b	NP_057157, HRP3	hepatoma-derived growth factor-related protein 2 isoform 1,2	Versch./Zellwachstum
71	b	NP_060663, KIA1794	hypothetical protein LOC55215	Verschiedene

Tabelle 4 fortgesetzt: Durch LC-MS identifizierte Kandidateninteraktoren aus den Proben MYC/a und MYC/b				
Lfd. Nr.	Probe	Protein ID, Gen Symbol	Protein Name	Funktion
72	a		IFP38	Verschiedene
73	a	NP_116263	KIAA1984***	Verschiedene
74	a	NP_005585, NACA	nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide	Proteinfaltung
75	a	NP_004732, NOLC1	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	Chromatin/Transkription
76	b	NP_002954, S100A7	S100 calcium binding protein A7	Verschiedene
77	a	NP_945327, TH1L	TH1-like protein**	Verschiedene
78	a		unnamed protein	Verschiedene
79	b	NP_005654, WHSC2	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 2**	Chromatin/Transkription
80	b	NP_612446, GPRASP2	G protein-coupled receptor associated sorting protein 2	Verschiedene
81	b	NP_003911, TIMELESS	Timeless homolog (Drosophila)	Verschiedene
82	b	NP_004138, DRG1	developmentally regulated GTP binding protein 1**	Verschiedene

Tabelle 5: Durch LC-MS identifizierte Kandidateninteraktoren aus der Probe MIZ/MYC			
Lfd. Nr.	Protein ID, Gen Symbol	Protein Name	Funktion
1	NP_000050, BRCA2	BRCA2 breast cancer 2, early onset	Chromatin/Transkription
2	NP_005843, CHD3	chromodomain helicase DNA binding protein 3 isoform 1,2,3	Chromatin/Transkription
3	NP_001264, CHD4	chromodomain helicase DNA binding protein 4***	Chromatin/Transkription
4	NP_056372, CHD5	chromodomain helicase DNA binding protein 5***	Chromatin/Transkription
5	NP_056271, NELFB	Cofactor of Brca1	Chromatin/Transkription
6	NP_001370, DNMT1	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	Chromatin/Transkription
7	NP_001929, DR1	down-regulator of transcription 1, DR1	Chromatin/Transkription
8	NP_006433, DRAP1	DR1-associated protein 1	Chromatin/Transkription
9	NP_060941, LEREPO4	erythropoietin 4 immediate early response***	Chromatin/Transkription
10	NP_060130, GATAD2A	GATA zinc finger domain containing 2A	Chromatin/Transkription
11	NP_065750, GATA2B	GATA zinc finger domain containing 2B	Chromatin/Transkription
12	NP_005504, GTF2E1	general transcription factor IIE, polypeptide 1 (alpha subunit, 56 kDa)	Chromatin/Transkription
13	NP_002086, GTF2E1	general transcription factor IIE, polypeptide 2, beta 34kDa	Chromatin/Transkription
14	NP_001518, HDAC1 NP_004955, HDAC 2	histone deacetylase 1,2**	Chromatin/Transkription
15	NP_004730, MTA2	metastasis-associated protein 2, MTA2	Chromatin/Transkription
16	NP_003917, MBD3	methyl-CpG binding domain protein 3**	Chromatin/Transkription

Tabelle 5 fortgesetzt: Durch LC-MS identifizierte Kandidateninteraktoren aus der Probe MIZ/MYC			
Lfd. Nr.	Protein ID, Gen Symbol	Protein Name	Funktion
17	NP_006324, C1D	nuclear DNA-binding protein	Chromatin/Transkription
18	NP_002895, RDBP	RD RNA-binding protein	Chromatin/Transkription
19	NP_000440, RFX5	regulatory factor X, 5	Chromatin/Transkription
20	NP_000529, RFXAP	regulatory factor X-associated protein	Chromatin/Transkription
21	NP_005601, RBBP4	retinoblastoma binding protein 4**	Chromatin/Transkription
22	NP_004866, PLOR1C	RNA polymerase I subunit isoform 2**	Chromatin/Transkription
23	NP_604431, C19ORF2	RNA polymerase II subunit 5-mediating protein	Chromatin/Transkription
24	NP_003065, SMARCC1	Swi/Snf related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 1, Baf155	Chromatin/Transkription
25	NP_003066, SMARCC2	Swi/Snf related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily c, member 2, Baf170	Chromatin/Transkription
26	NP_003063, SMARCA4	Swi/Snf-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin a4	Chromatin/Transkription
27	NP_003070, SMARCE1	Swi/Snf-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin e1	Chromatin/Transkription
28	NP_945327, TH1L	TH1-like protein**	Chromatin/Transkription
29	NP_005654, WHSC2	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 2**	Chromatin/Transkription
30	XP_375646, ZNF525	Zinc finger protein 525	Chromatin/Transkription
31	NP_000170, MSH6	mutS homolog 6	DNA Reparatur
32	NP_057130, EXSOC1	exosomal core protein CSL4, exosome component 1	Exosom

Tabelle 5 fortgesetzt: Durch LC-MS identifizierte Kandidateninteraktoren aus der Probe MIZ/MYC

Lfd. Nr.	Protein ID, Gen Symbol	Protein Name	Funktion
33	NP_005024 , EXSOC9	Exosome complex exonuclease RRP45 (Exosome component 9)	Exosom
34	NP_001001998, EXSOC10	exosome component 10 isoform 1	Exosom
35	NP_055100, EXSOC2	exosome component 2**	Exosom
36	NP_057126 , EXSOC3	exosome component 3 isoform 1,2	Exosom
37	NP_061910, EXSOC4	exosome component 4	Exosom
38	NP_055819 , EXSOC7	exosome component 7**	Exosom
39	NP_852480, EXSOC8	exosome component 8	Exosom
40	NP_064543, EXSOC5	exosome component Rrp46; exosome component 5**	Exosom
41	NP_478126, EXSOC6	homolog of yeast mRNA transport regulator 3, Exosome component 6**	Exosom
42	NP_056175, SKIV2L2	superkiller viralicidic activity 2-like 2**	Exosom
43	NP_006422, CCT2	chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	Proteinfaltung
44	NP_002146, HSPA6	heat shock 70kDa protein 6 (Hsp70B')	Proteinfaltung
45		heat shock 70kDa protein 7	Proteinfaltung
46	NP_115580 , ASCC2	activating signal cointegrator 1 complex subunit 2	RNA Prozessierung
47	NP_006819, ASCC3	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3	RNA Prozessierung
48	NP_008937, NUDT21	cleavage and polyadenylation specific factor 5	RNA Prozessierung
49	NP_008938, CPSF6	cleavage and polyadenylation specific factor 6, 68 kD subunit**	RNA Prozessierung
50	NP_003578, DHX16	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 16***	RNA Prozessierung

Tabelle 5 fortgesetzt: Durch LC-MS identifizierte Kandidateninteraktoren aus der Probe MIZ/MYC			
Lfd. Nr.	Protein ID, Gen Symbol	Protein Name	Funktion
51	NP_078888, DDX40	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 40**	RNA Prozessierung
52	NP_113673, GRWD1	glutamate-rich WD repeat containing 1	RNA Prozessierung
53	NP_060308, NOLA2	nucleolar protein family A, member 2 isoform a,b	RNA Prozessierung
54	NP_008869, SNRPD1	small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide 16kDa***	RNA Prozessierung
55	NP_004587, SNRPA	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A***	RNA Prozessierung
56	NP_003087, SNRPG	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G***	RNA Prozessierung
57	NP_003088 NP_073718, SNRPN	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N	RNA Prozessierung
58	NP_006833, SF3B2	splicing factor 3b, subunit 2, 145kDa**	RNA Prozessierung
59	NP_001605, ACTG1	actin, gamma 1	Struktur/Cytoskelett
60	NP_001092, ACTB	beta actin	Struktur/Cytoskelett
61	NP_001008938, CKAP5	colonic and hepatic tumor over-expressed protein isoform a,b	Struktur/Cytoskelett
62	NP_778253, KRT1B	Keratin	Struktur/Cytoskelett
63	NP_060111, KIF21A	kinesin family member 21A	Struktur/Cytoskelett
64	XP_371332	Kinesin family member 21B	Struktur/Cytoskelett
65	NP_060046, KIF27	kinesin family member 27	Struktur/Cytoskelett
66	NP_008985, KIF3A	kinesin family member 3A***	Struktur/Cytoskelett
67	NP_004975, KIF5A	kinesin family member 5A	Struktur/Cytoskelett
68	NP_004511, KIF2	kinesin heavy chain member 2	Struktur/Cytoskelett

Tabelle 5 fortgesetzt: Durch LC-MS identifizierte Kandidateninteraktoren aus der Probe MIZ/MYC

Lfd. Nr.	Protein ID, Gen Symbol	Protein Name	Funktion
69	NP_958785 NP_958784, PLEC1	plectin 1	Struktur/Cytoskelett
70	NP_958783, PLEC1	plectin 1 isoform 7	Struktur/Cytoskelett
71	NP_003899, EIF2S2	eukaryotic translation initiation factor 2 beta***	Translationsinitiation
72	NP_004085, EIF2S1	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha, 35kDa***	Translationsinitiation
73	NP_001406, EIF2S3	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 gamma, 52kDa**	Translationsinitiation
74	NP_003745, EIF3S5	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon, 47 kDa**	Translationsinitiation
75	NP_001960 NP_892116, EIF5	eukaryotic translation initiation factor 5	Translationsinitiation
76	NP_003461, USP7	ubiquitin specific protease 7 (herpes virus-associated)	Ubiquitin „pathway“
77	NP_000182, HMGCL	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase	Metabolismus
78	NP_671700 AKAP9	A kinase (PRKA) anchor protein (yotiao) 9	Verschiedene
79	NP_852107, ADNP	activity-dependent neuroprotector	Verschiedene
80	NP_631895, AMPD2	adenosine monophosphate deaminase 2 (isoform L)	Metabolismus
81	NP_060217, ANKHD1	ankyrin repeat and KH domain containing 1 isoform 1***	Verschiedene
82	NP_060644, BPY2IP1	BPY2 interacting protein 1	Verschiedene
83	NP_057167, CNR1	cannabinoid receptor 1 (brain)	Verschiedene

Tabelle 5 fortgesetzt: Durch LC-MS identifizierte Kandidateninteraktoren aus der Probe MIZ/MYC			
Lfd. Nr.	Protein ID, Gen Symbol	Protein Name	Funktion
84	NP_004633, CDK2AP1	Cdk2-associated protein 1**	Verschiedene
85		Chain A, Nmr Structure Of An N-Terminal Fragment Of The Eukaryotic Initiation Factor 5 (Eif5)	Verschiedene
86	XP_028253	chromosome 19 open reading frame 7	Verschiedene
87	XP_046600	chromosome 20 open reading frame 74	Verschiedene
88	NP_055710	chromosome 6 open reading frame 84	Verschiedene
89	NP_075568	chromosome 8 open reading frame 33	Verschiedene
90	NP_115825, CC2D1B	coiled-coil and C2 domain containing 1B	Verschiedene
91	NP_212132, DOCK7	dedicator of cytokinesis 7	Verschiedene
92	NP_004138, DRG1	developmentally regulated GTP binding protein 1**	Verschiedene
93	NP_001354, DKC1	dyskerin	RNA Prozessierung
94	NP_003557, EEA1	early endosome antigen 1, 162kD	Versch./Transport
95	NP_003881, FCGBP	Fc fragment of IgG binding protein	Verschiedene
96	NP_001001520, HRP2	hepatoma-derived growth factor-related protein 2 isoform 1	Verschiedene
97		hypothetical protein LOC77305 isoform 1 [Mus musculus]	Verschiedene
98	NP_612395	hypothetical protein LOC92345	Verschiedene
99	NP_003015, ITSN1	intersectin 1 isoform ITSN-I	Verschiedene
100	NP_116263	KIAA1984***	Verschiedene

Tabelle 5 fortgesetzt: Durch LC-MS identifizierte Kandidateninteraktoren aus der Probe MIZ/MYC			
Lfd. Nr.	Protein ID, Gen Symbol	Protein Name	Funktion
101	NP_115541, LRR1Q1	leucine-rich repeats and IQ motif containing 1	Verschiedene
102	NP_005783, MPHOSPH6	M-phase phosphoprotein 6	Versch./Zellzyklus
103	NP_066565, NMT1	N-myristoyltransferase 1	Verschiedene
104	NP_060225, NSUN2	NOL1/NOP2/Sun domain family 2 protein	Verschiedene
105	NP_073568, NUCKS1	nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1	Verschiedene
106	NP_002699, PPP1CA	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform 1,2,3	Versch./Proliferation
107	NP_004714, ARHGEF2	rho/rac guanine nucleotide exchange factor 2	Verschiedene
108	NP_001026	ryanodine receptor 2 (cardiac)	Verschiedene
109	NP_056015, SCC112	SCC-112	Versch./Apoptose
110	NP_060731, EXOC1	SEC3-like 1 (S. cerevisiae)	Verschiedene
111	NP_004704, SDCCAG1	serologically defined colon cancer antigen 1	Verschiedene
112	NP_065813, SRGAP1	SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 1	Verschiedene
113	NP_057308, SNX9	sorting nexin 9	Versch./Transport
114	NP_443102, SNAG1	sorting nexin associated golgi protein 1	Versch./Transport
115	NP_878914, SYNE2	spectrin repeat containing, nuclear envelope 2	Struktur/Cytoskelett
116	NP_057726, SPTBN5	spectrin, beta, non-erythrocytic 5	Struktur/Cytoskelett
117	NP_597676, TTN	Titin	Struktur/Cytoskelett

Tabelle 5 fortgesetzt: Durch LC-MS identifizierte Kandidateninteraktoren aus der Probe MIZ/MYC

Lfd. Nr.	Protein ID, Gen Symbol	Protein Name	Funktion
119	NP_060707, CCAR1	cell division cycle and apoptosis regulator 1	Versch./Zellzyklus
120	NP_005336, HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A	Proteinfaltung
121	NP_006588, HSPA8	heat shock 70kDa protein 8 isoform 1**	Proteinfaltung
122	NP_003861, IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1***	Verschiedene
123	NP_056141, SRGAP2	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2	Verschiedene

4 Diskussion

Während der letzten Jahre wurden die Methoden der Proteomik zur Identifizierung und Charakterisierung von komplexen Proteingemischen erheblich verbessert. Besonders die Affinitäts-Aufreinigung nativer Proteinkomplexe in Kombination mit der Hochdurchsatz-Massenspektrometrie wurde weiterentwickelt. Diese Methoden stellen vor allem in Hinblick auf Auflösung und Vollständigkeit der identifizierten Bestandteile eine Verbesserung dar^{270, 272}. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Methoden etabliert, die eine Identifizierung von potentiellen Interaktionspartnern der Transkriptionsfaktoren c-Myc und Miz-1 durch die Massenspektrometrie erlauben: Die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung und eine chromatographische Fraktionierung für Proteinkomplexe mit c-Myc und Miz-1 Untereinheiten.

Bisher wurden Interaktionsuntersuchungen von Miz-1 und c-Myc insbesondere mit Zwei-Hybrid-Systemen in Hefe durchgeführt. Hefe-Zwei-Hybrid-Systeme zeigen allerdings einige Schwächen. Erstens detektieren Hefe-Zwei-Hybrid-Systeme Interaktionen dadurch, dass durch die untersuchte Interaktion ein Promotor aktiviert (oder auch reprimiert) wird. Nun verfügt c-Myc aber über eine intrinsische Transaktivierungsdomäne. Es ist daher schwierig, zwischen geringen Transaktivierungen durch schwache Interaktionen und falsch-positiven Transaktivierungen durch c-Myc alleine zu unterscheiden. Das gilt selbstverständlich auch für alle anderen Transkriptionsfaktoren mit Transaktivierungsdomänen. Zweitens erlauben Hefe-Zwei-Hybrid-Systeme nur die Identifizierung von zwei interagierenden Proteinen, nicht aber die Identifizierung von Proteinkomplexen als Modulatoren der Transkription. Daher wären viele Experimente notwendig, um an c-Myc bzw. Miz-1 bindende Proteinkomplexe zu beschreiben. Drittens sind viele der in *Mammalia* auftretenden Interaktionen nicht notwendigerweise auch in Hefe existent. Das Fehlen von Interaktionen mag z. B. an der unterschiedlichen Physiologie, an fehlenden posttranslationalen Modifikationen oder fehlerhafter Proteinfaltung in der Hefe liegen. Eine Möglichkeit diesen Nachteil zumindest teilweise zu umgehen, liegt in der Verwendung von Zwei-Hybrid-Systemen in Säugerzellen, die der physiologischen *in vivo* Situation angenähert sind.

Andere oft benutzte Methoden für die Identifizierung von Proteininteraktionen sind Koimmunopräzipitationen und Tandem-Affinitäts-Aufreinigungen (TAP).

Koimmunpräzipitationen bergen die Gefahr der Bindung von relativ vielen unspezifischen Kontaminanten, da bei dieser Methode nur ein einziger Reinigungsschritt durch die spezifische Antigen-Antikörper-Bindung genutzt wird. Dieser Nachteil kann durch die Einführung eines zweiten spezifischen Reinigungsschritts erheblich verringert werden. Dies wird in der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung umgesetzt. TAP-Analysen konnten bereits erfolgreich in *Bacteria*²⁷³, *Trypanosoma*²⁷⁴, Hefe^{268, 275, 276}, *C. elegans*²⁷⁷, *Drosophila*^{278, 279} und Säugerzelllinien²⁸⁰⁻²⁸³ durchgeführt werden.

Die vor kurzem veröffentlichten Arbeiten von Koch und Kollegen²⁸⁴ und Ewing und Kollegen²⁸⁵ sind für die Bewertung der vorliegenden Ergebnisse besonders wichtig, da in beiden Untersuchungen Hochdurchsatz-MS-Experimente zur Identifizierung von Interaktionspartnern von c-Myc eingesetzt wurden.

Koch *et al.*²⁸⁴ führten sechs TAP/MuDPIIT Experimente mit c-Myc durch. Das TAP „tag“ war mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten identisch. Zusätzlich trug das c-Myc Protein ein carboxyterminales Hämagglutinin (HA)-„tag“. MudPIT steht für Multidimensionale Protein-Identifizierungs-Technologie²⁸⁶ und ist eine LC/LC/MS/MS Anwendung mit der aus komplexen Gemischen Proteine identifiziert werden können. Die Experimente wurden in zwei humanen Epithelzelllinien (HEK293T und DLD1-tTA) durchgeführt. Koch und Kollegen konnten 221 neue potentielle Interaktionspartner von c-Myc identifizieren, von denen 10 in Immunopräzipitations-Experimenten als Interaktoren bestätigt wurden.

Ewing *et al.* wählten 338 krankheitsrelevante Proteine aus, unter anderem c-Myc, die sie mit einem FLAG-„tag“ fusionierten. In Hochdurchsatz-Immunopräzipitationen und nachfolgender LC-ESI-MS/MS identifizierten sie 24540 Protein-Protein-Interaktionen. Für c-Myc wurden 118 Interaktionen gefunden²⁸⁵.

Wie bereits erwähnt, kamen in der vorliegenden Arbeit zwei Methoden zur Anwendung, um mögliche Interaktionspartner der Transkriptionsfaktoren c-Myc und Miz-1 zu identifizieren. Zum einen wurde eine Tandem-Affinitäts-Aufreinigungsmethode etabliert, mit der Interaktionspartner von Miz-1 ermittelt werden können. Zum anderen wurde eine chromatographische Fraktionierung mit darauf folgender Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektroskopie (LC-MS/MS) durchgeführt, um Proteinuntereinheiten größerer Komplexe, die mit c-Myc bzw. mit Miz-1 assoziiert sind, zu identifizieren.

4.1 Tandem-Affinitäts-Aufreinigung

Im Tandem-Affinitätsansatz wurde ein so genannter TAP „tag“ C-terminal an das Miz-1 Protein angehängt (Abbildung 7). Das Fusionsprotein wurde in humane Zellen transfiziert und überexprimiert. Danach wurde das Miz-1-TAP Protein aus den Zellen mit dem Zweischnitt-Aufreinigungsvorgang des TAP-Ansatzes aufgereinigt. Potentielle Interaktionspartner wurden per LC-MS/MS Analyse identifiziert.

Die in dieser Arbeit verwendete Tandem-Affinitäts-Aufreinigung wurde von Rigaut und Kollegen²⁶⁸ entwickelt und erfolgreich in Hefe angewandt. Der Ansatz ermöglicht die Aufreinigung intakter, nativer Multiproteinkomplexe. Durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen „tags“ wird die Kontamination mit unspezifisch bindenden Proteinen stark verringert. Die Umsetzung der Hefetechnik in Säugerzelllinien bringt allerdings einige Schwierigkeiten mit sich. Ein offensichtlicher Vorteil des Hefe-Systems ist die relativ einfache Handhabung von Suspensionskulturen, in denen in kurzer Zeit große Mengen des Fusionsproteins hergestellt werden können. Wegen der im Vergleich zu Säugerzellen kurzen Generationsdauer und der Möglichkeit Hefezellen mit viel größerer Zelldichte anzuziehen, ist eine Überexpression des Fusionsproteins nicht zwingend erforderlich. Zum anderen kann man bei den Hefe-Systemen Zelllinien verwenden, die im Vergleich zu den Wildtyp-Stämmen vergleichsweise geringe genetische Veränderungen aufweisen. Das Fusionsprotein wird durch homologe Rekombination ins Genom der Hefe aufgenommen, wodurch der endogene Promotor intakt bleibt. Die Stöchiometrie der Bindungspartner bleibt so erhalten, was z. B. bei der Überexpression durch transiente Transfektion in *Mammalia* nicht der Fall ist und daher weniger häufige Bindungspartner schwerer identifiziert werden können²⁸⁷. Ein weiteres Problem bei Systemen mit Säugerzellen ist, dass das endogene Gen intakt bleibt und mit dem exogenen TAP-Konstrukt um die Bindungspartner kompetitiert.

Es ist zwar möglich auch mit Säugerzellen große Mengen an Zellmaterial in Suspensionskulturen heranzuziehen, allerdings ist die Handhabung schwieriger. Bei den humanen Suspensionszellen handelt es sich um transformierte Zelllinien, die sich in entscheidenden Eigenschaften, z. B. in erhöhten Zellteilungsrate, vom Wildtyp unterscheiden. Bei der Nutzung solcher Systeme besteht immer die Gefahr, dass sich genau diese veränderten Eigenschaften modifizierend auf das gewünschte Ergebnis

auswirken. Eine weitere Schwierigkeit besteht darin, das Protein in ausreichender Menge zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit gelang es nicht, das Miz-1 Protein mit einem viralen Vektor stabil in die Zellen einzubringen. Das kann mit der Funktion des Miz-1 Proteins beim Zellzyklusarrest erklärt werden. Mit der Überexpression des Proteins werden z. B. *p15Ink4B* und *p21Cip1* aktiviert. Infizierte Zellen wachsen daher sehr langsam und unter Stressbedingungen (wie z. B. der Suspensionskultur) gehen sie in den Zellarrest. Das Misslingen einer stabilen Infektion mit Miz-1-TAP lässt hingegen auf eine intakte Funktion des Konstrukts schließen. Im hier verwendeten Ansatz wurden daher Zellkulturschalen mit der CaCl₂ Methode transfiziert.

Ein weiterer allgemeiner Nachteil der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung ist die Verwendung des relativ großen TAP „tags“ mit einem Molekulargewicht von etwa 25 kDa. Forler und Kollegen fanden eine starke Beeinträchtigung der *in vivo* Funktionen in Hefe: Die Einführung C-terminaler „tags“ an essentielle Gene führte bei 18% der Hefe-Stämme zu Letalität²⁷⁸. Es ist unwahrscheinlich, dass dieser Effekt von Änderungen in den Expressionsmustern der „getaggten“ Proteine herrührt, da die endogenen Gene durch homologe Rekombination ausgetauscht wurden.

Ein anderer Nachteil der hier beschriebenen TAP-Methode ist die relativ schwache Bindung von CBP an die verwendete Calmodulin-Matrix. Durch die Ineffizienz dieser Bindung verringert sich die Ausbeute gereinigter Proteinkomplexe erheblich. Weiterentwickelte Tandem-Affinitäts-Aufreinigungen nutzen daher Protokolle, bei denen der CBP „tag“ z. B. durch Streptavidin²⁸⁸, Biotinylierung²⁸⁹ oder ein Protein C Epitop²⁹⁰ ersetzt wurde. Ein Vergleich des in dieser Arbeit verwendeten TAP-„tags“ mit einer FLAG-HIS-„tag“ Kombination zeigte eine Ausbeute für TAP von 1% und für FLAG-HIS von 19% für das jeweils „getaggte“ Protein²⁹¹.

Zur Überprüfung der Funktionalität des Miz-1-TAP Konstrukts wurde zunächst ein Luziferase Reporter „Assay“ zum Vergleich mit dem Miz-1 Wildtyp-Protein (Miz-1 wt) durchgeführt. Die Aktivierung des *p15Ink4B* Promotors durch Miz-1 und seine Hemmung durch Bindung von c-Myc an Miz-1 sind gut beschrieben¹⁹³. Erwartungsgemäß konnte sowohl das Fusionskonstrukt als auch Miz-1 wt das p15-Promotorkonstrukt aktivieren. Beide wurden durch c-Myc gehemmt, was darauf schließen lässt, dass c-Myc auch an das Fusionskonstrukt binden kann (Abbildung 8). Zum weiteren Nachweis der Funktionalität wurde die Kernlokalisierung von Miz-1-TAP überprüft. Weil Miz-1 selbst keine Kernlokalisierungssequenz besitzt, muss es durch

Bindung an andere Faktoren in den Zellkern transportiert werden. Die Kernlokalisation kann zum Beispiel durch c-Myc vermittelt werden. Zum Nachweis wurden identische Proteinmengen Gesamtzellextrakt und Kernlysate verglichen. Die relative Menge Miz-1 Protein im Kernlysate war größer als die im Gesamtzellextrakt, was darauf schließen läßt, dass Miz-1 TAP mit anderen Faktoren in den Zellkern kolokalisierte (Abbildung 9).

Um die Funktion des TAP „tags“ zu prüfen, wurden zunächst Reinigungen in analytischem Maßstab durchgeführt. Bei einem funktionellen TAP „tag“ sollte sich das Fusionsprotein nach der TEV Spaltung um die Größe des Protein A (ca. 20 kDa) verkürzt haben. Dies bestätigte sich im Western Blot mit einem anti-Miz-1 Antikörper (Abbildung 10). Silberfärbungen der SDS-Gele wiesen eine stark angereicherte Bande auf, die der errechneten Größe des Miz-1-TAP Fusionsproteins entsprach, so dass von einer korrekten Funktionalität sowohl des Miz-1 Teils als auch des TAP „tags“ ausgegangen werden konnte (Abbildung 11). Es zeigte sich allerdings im Western Blot Vergleich der Zwischenprodukte, dass sich die Menge an Fusionsprotein vom Ausgangslysate bis hin zum Endprodukt etwa um den Faktor 80 verringerte. Durch die Überexpression des Miz-1-TAP Proteins lag dieses in viel höherer Kopienzahl als seine potentiellen Bindungspartner vor. Wegen der Verringerung der Menge an Miz-1-TAP Protein auf etwa 3% der Ausgangsmenge durch die Reinigungsprozedur, ist es möglich, dass die Menge der Bindungspartner unter der Nachweisgrenze der kolloidalen Coomassie-Blaufärbung und sogar unter der Nachweisgrenze von Western Blots lag. Das würde erklären, warum c-Myc als bekannter Interaktionspartner von Miz-1 auch im Western Blot nicht nachgewiesen werden konnte.

4.1.1 Miz-1 Interaktion mit Hsp70

Mit Hilfe der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung konnte das Chaperon Hsp70 (heat shock protein 70 kDa) als Interaktionspartner von Miz-1 identifiziert werden. Im Allgemeinen bezeichnet man solche Proteine als Chaperone, die andere Proteine bei der korrekten räumlichen Faltung unterstützen. Die Hsp70 Familie gehört zu den am besten untersuchten Chaperonen. Wie die meisten Chaperone ist Hsp70 ein Hitzeschockprotein, das in Folge von erhöhten Temperaturen oder anderen zellulären Stressauslösern exprimiert wird. Erhöhte Temperaturen und auch andere Stressoren können zu einer falschen Faltung von Proteinen, z. B. durch Hitze-Denaturierung,

führen. Chaperone können unter ATP-Verbrauch fehlgefaltete Proteine wieder in die richtige räumliche Anordnung zurückbringen²⁹².

Obwohl Hsp70 eine Reihe von Protein-Protein Interaktionen eingeht, konnte eine direkte Interaktion mit Miz-1 oder c-Myc bisher nicht nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden allerdings mit dem Fraktionierungsansatz zwei Mitglieder der Hsp70 Familie als potentielle Interaktionspartner von Miz-1 bzw. c-Myc identifiziert.

Koch und Kollegen²⁸⁴ konnten 13 weitere Hitzeschockproteine als Interaktionspartner von c-Myc nachweisen, darunter auch 3 Homologe von DnaJ aus *Escherichia coli*. In *E. coli* interagieren DnaJ Proteine mit DnaK. DnaK wiederum ist ein Homologon von Hsp70. In nachfolgenden Untersuchungen sollte eine Interaktion von Hsp70 durch Immunpräzipitation bestätigt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die entdeckte Interaktion von Miz-1 mit Hsp70 ein Artefakt ist, das durch die Überexpression des exogenen Miz-1-TAP Proteins ausgelöst wurde.

Ein Problem des großen molaren Überschusses von Miz-1-TAP ist, dass Interaktionspartner, die in viel geringerer Konzentration vorliegen, möglicherweise durch stabilere Interaktionspartner, die in höherer Konzentration vorhanden sind, aus der Bindung verdrängt werden. Sollte das für Hsp70 der Fall sein, so wäre dies eine Erklärung für das Vorliegen falsch negativer Ergebnisse, wie z. B. der fehlende Nachweis von c-Myc als bekanntem Interaktionspartner von Miz-1²⁷².

Interessanterweise scheint Hsp70, neben der Unterstützung bei der Proteinfaltung, noch weitere Funktionen auszuüben. Eine erhöhte Expression von Chaperonen, wie Hsp70, wurde sowohl in soliden Tumoren^{293, 294} als auch bei hämatologischen Malignomen nachgewiesen²⁹⁵. Bei Brustkrebs korreliert die Überexpression von Hsp70 mit einer schlechten Prognose²⁹⁶. Mitglieder der Hsp70 Familie sind bekannt als anti-Apoptose Faktoren²⁹⁷. Möglicherweise spielt eine Interaktion zwischen Hsp70 und Miz-1 bei der Blockierung der durch c-Myc ausgelösten Apoptose durch Miz-1 eine Rolle^{251, 252}. Die physiologische Bedeutung einer Interaktion von Hsp70 und Miz-1 sollte in zukünftigen Untersuchungen nach ihrer Validierung weiterverfolgt werden.

4.1.2 Verschiedene Genprodukte von Miz-1?

Bei der Identifizierung der durch die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung angereicherten Proteine konnten im SDS-Gel vier verschiedene Polypeptide identifiziert werden. Eines dieser Proteine war Hsp70 (s. 4.1.1); die drei anderen Polypeptide stellten verschiedene Formen von Miz-1 selbst dar. Die Molekulargewichte

der verschiedenen Miz-1 Formen lagen bei 100 kDa oder darüber. Die Aufreinigung im analytischen Maßstab zeigte, dass auch der Hauptanteil des angereicherten Miz-1-TAP Fusionsproteins eine Größe von über 98 kDa besitzt. Die verschiedenen Banden wiesen eine unterschiedliche Zusammensetzung der durch MS identifizierten Peptide auf. Eine Erklärung für diese Unterschiede könnten posttranslationale Modifikationen am Miz-1 Protein sein, die dazu führen, dass der Verdau durch Endopeptidasen nicht an identischen Aminosäuren stattfindet und dass sich durch Ladungsänderungen das Laufverhalten der Miz-1 Varianten verändert. Auszuschließen ist auch nicht, dass sich während der Aufreinigung aminoterminal Abbauprodukte gebildet haben, die ein unterschiedliches Laufverhalten erklären könnten. In früheren Arbeit mit dem 10E2-anti-Miz-1 Antikörper ist das Auftreten eines Bandentriplets im Western Blot beobachtet worden ¹⁹³. Das Auftreten verschiedener Miz-1 Varianten wäre eine Erklärung für dieses Phänomen. Unterschiedliche Miz-1 Varianten könnten durch alternatives Spleißen oder zusätzliche Start-Codons im *miz-1* Gen entstanden sein.

4.1.3 Tandem-Affinitäts-Aufreinigung: Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit gelang es, ein funktionales Miz-1-TAP Fusionsprotein in einer humanen Epithelzelllinie zu exprimieren und die TAP Reinigung zu etablieren. So konnte Hsp70 als potentieller Interaktionspartner von Miz-1 über eine LC-Massenspektroskopie identifiziert werden. Miz-1 selbst wurde im SDS-Gel in drei Banden unterschiedlichen Molekulargewichts nachgewiesen. Die identifizierten Miz-1 Polypeptide unterschieden sich in der Zusammensetzung der identifizierten Peptidmuster. Weitere Untersuchungen sollten zunächst die Interaktion von Miz-1 und Hsp70 bestätigen, um dann die Funktionen dieser Assoziation in Physiologie und Tumorigenese und im Zusammenspiel mit c-Myc weiter zu erforschen. Eine Tandem-Affinitäts-Aufreinigung unter Verwendung einer verbesserten Zusammensetzung des „tags“ führt wahrscheinlich zur Identifizierung weiterer Interaktionspartner von Miz-1.

4.2 LC-MS Identifizierung von bona fide Interaktionen mit c-Myc bzw. Miz-1

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Multiproteinkomplexe, die c-Myc und Miz-1 als potentielle Untereinheiten enthalten, gereinigt und angereichert.

Ausgehend von einem Kernlysat aus HEK293T Suspensionzellen wurden Proteinkomplexe über Ionenaustausch-Chromatographie und Größenausschluß-Chromatographie so fraktioniert, dass eine massenspektrometrische Identifizierung durch LC-MS/MS möglich wurde.

Mit einem einzelnen LC-MS/MS Experiment ist man heute in der Lage, einige hundert bis zu tausend Proteine nachzuweisen und zu quantifizieren. Eine solche Auflösung ist ausreichend, um kleinere Proteome, z. B. von Viren oder anderen Organismen mit kleinem Genom, zu beschreiben²⁷⁰. Es ist jedoch nicht möglich, die 5×10^4 verschiedenen Proteine eukaryotischer Proteome mit der LC-MS/MS abzudecken²⁶⁹. Hierfür ist eine der Massenspektrometrie voran gestellte Fraktionierung notwendig.

4.2.1 Etablierung des Fraktionierungsschemas

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Fraktionierungsschema zur Anreicherung von Proteinkomplexen, die c-Myc bzw. Miz-1 enthalten, entwickelt. Basierend auf den Arbeiten von Meissner *et al.*²⁷¹ und Roy *et al.*⁴⁶ wurde zunächst das Fraktionierungsschema im analytischen Maßstab etabliert (Abbildung 14) und davon das Schema für die präparative Fraktionierung abgeleitet (Abbildung 19).

Die präparative Fraktionierung stellt eine Abfolge chromatographischer Säulen dar. Im Verlauf der Fraktionierung wurden die Fraktionen weiterverwendet, welche die höchsten Konzentrationen von c-Myc bzw. Miz-1 im Western Blot zeigten. In einer Größenausschluß-Chromatographie wurden nur diejenigen Fraktionen weiterverwendet, die Partikel mit einer Mindestgröße von 600 kDa enthielten. Auf diese Weise wurden Multiproteinkomplexe mit mehreren Untereinheiten von kleineren Aggregaten oder Einzelproteinen getrennt.

Aus dem letzten Fraktionierungsschritt wurden 3 Proben ausgewählt, die der massenspektrometrischen Analyse zugeführt werden sollten. Zwei dieser Proben (MYC/a- und MYC/b-Proben) stammten aus derselben Fraktion (Fraktion 11, Abbildung 22) und waren daher identisch in Ihrer Zusammensetzung. Diese Vorgehensweise sollte eine Schätzung der Reliabilität der massenspektrometrischen Peptididentifizierung aus den komplexen Proteingemischen der Fraktionen ermöglichen. Die ausgewählte Fraktion (Fraktion 11 aus Abbildung MonoS) enthielt nach Schätzung aus der Western Blot Analyse wesentlich mehr c-Myc als Miz-1. Die zweite ausgewählte Fraktion (Fraktion 5, Abbildung 22) enthielt nach Beurteilung der

Signalstärke etwa gleiche Mengen an c-Myc und Miz-1 (im folgenden MIZ/MYC Fraktion).

4.2.2 Potentielle Protein-Protein Interaktionspartner von c-Myc bzw. Miz-1

Die LC-MS/MS Analyse der Fraktionen generiert Listen von Proteinen, die aus einer bestimmten Probe über ihre Peptidzusammensetzung identifiziert werden konnten. Dadurch ist nicht notwendigerweise die Zusammensetzung eines bestimmten Proteinkomplexes gezeigt. Das Ergebnis eines einzelnen LC-MS/MS Experiments repräsentiert nur den „Durchschnitt“ der Bindungspartner oder der Komplexkomponenten in der jeweiligen Probe. Die identifizierten Proteine sind daher nur potentielle Untereinheiten von Komplexen, die c-Myc oder Miz-1 oder beide Proteine enthalten.

Nachfolgende Untersuchungen sollten daher zunächst eine tatsächliche Interaktion nachweisen. Die gewonnenen Ergebnisse dienen dazu, sinnvolle Hypothesen über neue Interaktionspartner zu entwickeln und zu neuen biologischen Funktionen und Wirkmechanismen von c-Myc und Miz-1 zu generieren. Verglichen werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit vor allem mit zwei Untersuchungen, die ebenfalls mit Hochdurchsatzmethoden potentielle Interaktionspartner von c-Myc identifiziert haben^{284, 285}.

Aus den durchgeführten drei LC-MS/MS Experimenten konnten insgesamt 171 Proteine identifiziert werden (Tabellen 4 & 5). 15 der identifizierten Proteine konnten bereits als Interaktionspartner von c-Myc nachgewiesen werden.

Zwölf Proteine waren in allen drei Experimenten detektierbar: Chd4, Chd5, Dhx16, SnrpD1, SnrpDA, SnrpG, IQGAP1, Kif3a, EIF2S1, EIF2S2, ANKHD1 und Erythropoitin 4 immediate early response.

Schon diese Auswahl legt nahe, dass die potentiellen Interaktionspartner von c-Myc bzw. Miz-1 nicht allein im Kontext der transkriptionellen Regulation zu finden sind, sondern auch bei der RNA Prozessierung, der Translationsinitiation und bei der Zellstruktur. Kürzlich konnten Dominguez-Sola und Kollegen nachweisen, dass c-Myc eine Funktion in der Kontrolle der DNA-Replikation ausübt, die nicht auf Genaktivierung oder Repression basiert²⁶⁴. Koch *et al.*²⁸⁴ und Ewing *et al.*²⁸⁵ schlagen eine Beteiligung von c-Myc an weiteren zellulären Prozessen, wie der DNA-

Synthese, den DNA-Reparaturmechanismen, der mRNA Prozessierung sowie der Proteinfaltung, -modifikation und -degradation vor.

In den folgenden Abschnitten wird auf eine Auswahl der hier gefundenen potentiellen Interaktionen im Kontext ihrer funktionellen Klassifikation und in bezug auf eine mögliche Kooperation mit c-Myc oder Miz-1 bei zellulären Vorgängen eingegangen.

4.2.3 Transkriptionsfaktoren und/oder Chromatin-Remodelling-Komplexe

Zu den wichtigsten Komplexen, die an der Transkription beteiligt sind, gehören zum einen die Komplexe der RNA Polymerasen I, II und III (s.5.2.5) und zum anderen die Chromatin-Remodelling-Komplexe, welche die Nukleosomen mobilisieren, um das Chromatin für Transkriptionsfaktoren, wie Histonacetylase- oder -deacetylase-Komplexe, zugänglich zu machen.

In der vorliegenden Arbeit konnten Proteine nachgewiesen werden, die als Untereinheiten zusammen mit c-Myc oder Miz-1 solche Komplexe bilden. In den Fraktionen MYC/a und MYC/b wurden Chd4, Chd5, GTFIIIC, HDAC1, HDAC2 und MBD3 gefunden. Die Fraktion MIZ/MYC enthielt, neben vielen weiteren Transkriptionsfaktoren, Chd3, Chd4, Chd5, Dnmt1, HDAC1, HDAC2, Baf155 (SMARCC1), Baf170 (SMARCC2), Baf57 (SMARCA4) sowie Brg1 (SMARCA4). Viele dieser Proteine wurden bereits von Koch *et al.* beschrieben²⁸⁴.

c-Myc ist sowohl Aktivator als auch Repressor der Transkription. Chd3 und Chd4 zusammen mit MBD3, HDAC1 und HDAC2 sind Komponenten der Mi-2/NuRD Komplexe. NURD Komplexe können über ihre Chromatin-Deacetylierungsfunktion die Transkription reprimieren.

Brenner und Kollegen konnten zeigen, dass die DNA Methyltransferase Dnmt3a an Miz-1 Zielpromotoren, die durch c-Myc reprimiert werden, bindet⁹⁰. Es ist bekannt, dass Dnmt3a HDACs rekrutiert, was wiederum zur Repression führen kann²⁹⁸. Eine ähnliche Rolle könnte Dnmt1 spielen, dass in dieser Arbeit als möglicher Kofaktor von c-Myc und Miz-1 identifiziert wurde.

Der Swi/Snf Komplex ist ein Chromatin-Remodelling-Komplex, der die Energie aus der ATP-Hydrolyse nutzt, um Nukleosomen zu mobilisieren und die Chromatinstruktur zu restrukturieren. Der Swi/Snf Komplex besteht aus mindestens neun Untereinheiten. Darin enthalten sind invariante Kernuntereinheiten und variable

Untereinheiten, die zur transkriptionellen Aktivierung oder Reprimierung beitragen. Phelan *et al.*²⁹⁹ konnten die funktionellen Kernuntereinheiten des humanen Swi/Snf Komplexes definieren. Dazu gehören SNF5 (auch Ini1), Baf155, Baf170 und Brg1 bzw. Brm, die vergleichbar hohe *in vitro* Remodellierungs-Raten wie der Gesamtkomplex zeigen.

Swi/Snf Komplexe können an der Tumorigenese beteiligt sein. Einige Untereinheiten weisen entweder intrinsische Tumorsuppressor-Eigenschaften auf oder werden für die Aktivität anderer Tumorsuppressoren benötigt.

Der Swi/Snf Komplex ist sowohl in Aktivierung als auch Reprimierung von Zielgenen involviert. Es gibt Hinweise dafür, dass er auch für die Transaktivierung durch c-Myc benötigt wird^{55, 96, 300}. Die Repeat 1 Domäne von SNF5 interagiert mit der HLH/LZ Domäne von c-Myc⁵⁵. SNF5 und Brg1 scheinen, für die Transaktivierung durch c-Myc notwendig zu sein. Mutationen in SNF5 und auch in Brg1 supprimieren die Transaktivierung von c-Myc Zielgenen. Ein möglicher Mechanismus ist die Bindung von ORC1 an den C-Terminus von c-Myc. Der ORC1 Komplex inhibiert die E-Box abhängige Transkription und SNF5 konkurriert mit ORC1 um die Bindung an c-Myc⁹³. Baf53 bindet ebenfalls direkt an c-Myc und ist notwendig für die Transformation durch c-Myc⁹⁶.

c-Myc interagiert sowohl mit NURD-Komponenten als auch mit Swi/Snf Komplexen. Diese Interaktionen können eine mechanistische Basis sowohl für die Aktivierung der Transkription als auch für die Repression durch c-Myc sein. Eine genaue Aufklärung der Beteiligung solcher Komplexe an den Regulationsmechanismen wird durch die Tatsache erschwert, dass z. B. Swi/Snf Komplexe sowohl reprimierend als auch aktivierend wirken könnten.

4.2.4 Untereinheiten der basalen RNA Polymerase-Maschinerie

Die Aktivierung aller drei eukaryotischen RNA Polymerasen ist notwendig für die c-Myc Funktion, speziell bei der Zellproliferation und dem Zellwachstum³⁰¹. In der vorliegenden Arbeit wurden Untereinheiten der Transkriptionsmaschinerie von allen drei Polymerase-Komplexen gefunden. Die Proben MYC/a und MYC/b enthielten sowohl eine Untereinheit von RNA PolII und RNA PolIII sowie drei Untereinheiten von GTFIIIC (General transcription factor III C). Die Probe MIZ/MYC enthielt die gleiche PolII Untereinheit, die in den Proben MYC/a und MYC/b gefunden wurden, sowie Faktoren für die PolII Transkription (GTF2E).

Eine Regulation der PolII Aktivität über den p-TEFb Komplex wurde bereits beschrieben⁸⁰. Auch TBP und TFII-I, Untereinheiten der basalen Transkriptionsmaschinerie, sind Interaktoren von c-Myc^{46, 84}. In diesem Zusammenhang könnten die GTF2E Proteine als Untereinheiten von Transkriptionskomplexen mit c-Myc und Miz-1 eine Rolle spielen.

Die Möglichkeit einer Interaktion von c-Myc mit GTFIIC, die auch von Koch *et al.* gefunden wurde, würde den Zusammenhang der c-Myc Aktivität und der Ribosomen-Biogenese weiter verstärken. GTFIIC ist wie GTFIIB für die Induktion der Transkription von tRNA und 5S RNA durch PolIII notwendig^{176, 302}. c-Myc bindet und aktiviert GTFIIB; das führt zu einer Induktion der PolIII Transkription³⁰³. Eine ähnliche Funktion könnte durch die Interaktion von c-Myc und GTFIIC ausgeübt werden.

4.2.5 Faktoren der RNA-Prozessierung.

Viele der bei der Fraktionierung identifizierten Proteine stellen Komponenten der RNA Prozessierung dar. Unter RNA Prozessierung im Allgemeinen versteht man das Hinzufügen von Sequenzen in die mRNA-Basenabfolge, wie das 5' „Capping“ oder das Anhängen des 3' PolyA Schwanzes, sowie das Entfernen von Sequenzen, wie z. B. die von Introns (Spleißen). Weiter zählt dazu die Degradation der RNA (z. B. durch das Exosom), das „Editing“ und der Transport der mRNA ins Cytoplasma (Übersicht s. z. B. Maquat³⁰⁴).

Die Identifizierung von U5-200 kDa, U1-70 kDa, Splicing factor 3b und einigen weiteren Riboproteinen in dieser Arbeit, könnte auf eine bisher unbekannte, direkte Rolle von c-Myc bei der RNA Prozessierung, speziell beim Spleißen hinweisen. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass sowohl Koch *et al.*²⁸⁴, Ewing *et al.*²⁸⁵ und Dominguez-Sola *et al.*²⁶⁴ U5-200 kDa als Interaktionspartner von c-Myc identifiziert haben.

U5-200 kDa gehört zur Familie der DEXH Helikasen und ist für das Ausschneiden der RNA Lasso Struktur beim Spleißen notwendig³⁰⁵. Anomalien der Spleißvorgänge treten häufig bei Krebserkrankungen auf. Solche Anomalien betreffen Gene, die sowohl bei der Zellmigration, der Wachstumsregulation, der Reaktion auf Hormonsignale und der Chemotherapie eine Rolle spielen³⁰⁶⁻³⁰⁸. Durch die Interaktion mit dem U5 Komplex verstärkt c-Myc bzw. Miz-1 möglicherweise die Spleißrate und erhöht so die Konzentration von prozessierten mRNAs, die für Proteine kodieren, die

für Zellwachstum und Proliferation benötigt werden. Umgekehrt kann die Deregulierung dieser Vorgänge das Auslösen der Tumorigenese bedeuten.

Bekannt ist auch, dass c-Myc Gene die Ribosomen-Biogenese regulieren²⁵⁵. Die Synthese der Ribosomen findet primär im Nukleolus statt. Dort werden die rRNA Gene transkribiert. Die dabei entstehenden rRNA Vorstufen werden prozessiert und modifiziert. c-Myc reguliert die rRNA Prozessierung durch Aktivierung von Zielgenen¹⁷⁸. Man weiß, dass die deregulierte Ribosomen-Biogenese während der Tumorigenese eine Rolle spielt³⁰⁹. Bereits seit langem ist bekannt, dass eine Hypertrophie des Nukleolus ein cytologisches Charakteristikum von Tumorzellen ist und als prognostischer Hinweis genutzt werden kann³¹⁰. c-Myc induziert die Ribosomen-Biogenese und die Protein-Biosynthese u.a. durch die RNA Prozessierung¹⁷⁸. Möglicherweise reguliert c-Myc nicht nur die rRNA Prozessierung, sondern auch die anderer RNA Typen durch direkte Interaktion mit den beteiligten Komplexen. Diese Regulation könnte ein wichtiger Mechanismus für die Induktion des Zellwachstums und auch der Tumorigenese durch c-Myc sein.

In Eukaryoten besteht das Exosom aus 9-11 Proteinen, die RNA Moleküle in 3'→5' Richtung abbauen, indem sie eine 3'Phosphodiesterbindung spalten. Das Exosom spielt eine essentielle Rolle beim mRNA Abbau und in der Prozessierung bestimmter ribosomaler und kleiner nucleulärer RNAs (small nucleolar RNA, snRNA). Übersichten geben Baker und Parker³¹¹, Houseley *et al.*³¹² und Raijmakers *et al.*³¹³. Bisher sind keine Interaktionen der c-Myc oder Miz-1 Proteine mit dem Exosom bekannt. Koch *et al.* konnten zwar einige an der RNA Prozessierung beteiligten Proteine als c-Myc Interaktionspartner identifizieren, allerdings nur ein Protein (XRN1, 5'→3' Exoribonuclease), das direkt am mRNA Abbau beteiligt ist und mit vielen Exosomen-Komponenten interagiert sowie interessanterweise auch mit Chd4³¹⁴.

Ewing *et al.* hingegen wiesen SKIV2L (superkiller viralicidic activity 2-like), das neben fast allen Untereinheiten des humanen Exosoms sowohl in den Fraktionen MYC/a,b als auch in MIZ/MYC gefunden wurde, nach. SKIV2L besitzt eine Helikase-Funktion, die für den mRNA Abbau durch das Exosom notwendig ist. Über eine direkte Verbindung könnte c-Myc die Stabilität verschiedener mRNAs steuern, deren Menge sowohl in der Tumorigenese als auch bei physiologischen Funktionen von c-Myc und Miz-1 von Bedeutung sind.

4.2.6 DNA-Reparaturfaktoren.

Fehlfunktionen bei den DNA-Reparaturmechanismen können zum Verlust der Zellzykluskontrolle führen. Dieser Verlust tritt häufig zusammen mit einer Hypersensitivität der DNA gegen DNA-Noxen und einer genetischen Instabilität auf, die zu Mutationen wie karyotypischen Abnormalitäten führen können (z. B. Bartek *et al.* ³¹⁵). Derartige Veränderungen werden infolge einer fehlerhaften Regulation von *c-myc* beobachtet ³¹⁶.

Miz-1 ist für die Steuerung von zwei unterschiedlichen Programmen der Genexpression, die nach DNA-Schäden ausgelöst werden, notwendig. 1) Miz-1 aktiviert eine große Gruppe von Genen, welche wiederum von *c-Myc* reprimiert werden, wie z. B. *p21Cip1* ¹⁸⁹, *TBOX3* (ein Inhibitor von p19Arf) ³¹⁷ und *dapper* (ein Inhibitor von β -catenin) ³¹⁸. 2) Miz-1 reprimiert eine weitere Gruppe von Genen nach DNA-Schäden. Diese Repressorfunktion von Miz-1 wird nicht von *c-Myc*, sondern von 14-3-3 η reguliert ¹⁴⁷.

Während Koch *et al.* ²⁸⁴ acht Proteininteraktionen von *c-Myc* mit DNA-Reparaturfaktoren fanden, konnte in der vorliegenden Arbeit nur ein Genprodukt der DNA-Reparatur identifiziert werden: Msh6. Msh6 wurde nur in der *Myc/Miz* Fraktion gefunden. Interessanterweise entdeckten Ewing *et al.* ebenfalls Msh6 als Interaktionspartner von *c-Myc* ²⁸⁵. Zusammen mit Msh2, welches auch von Koch und Kollegen beschrieben wurde, bildet Msh6 ein Heterodimer ³¹⁹⁻³²². Dieses Heterodimer spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung und der Bindung von DNA-Läsionen und dem DNA-„mismatch“-Reparatursystem ³²². Außerdem konnte gezeigt werden, dass Max mit Msh2 interagiert und *c-Myc* mit einem weiteren DNA-„mismatch“-Reparaturprotein: Mlh1 ⁷¹. *msh2* und *msh6* sind selbst Zielgene von *c-Myc* ³²³. Es gibt weitere Hinweise auf eine Rolle von *c-Myc* in DNA-Reparatur-Mechanismen: In humanen Fibroblasten, die *c-Myc* exprimieren, werden Doppelstrangbrüche ineffizient repariert ³²⁴. In Lymphomen und anderen Tumoren wurde eine erhöhte genomische Instabilität auf Grund einer deregulierten *c-Myc* Expression festgestellt ³²⁵⁻³²⁷.

Die vorgestellten Ergebnisse und die Ergebnisse von Koch *et al.*, die zusätzlich zu Msh2 und Msh6, die DNA-Reparaturfaktoren Msh3, Ku70, Ku80 und DNA-PKc zusammen mit *c-Myc* aufreinigten, machen eine direkte Beteiligung von *c-Myc* an zellulären Reparaturmechanismen wahrscheinlich.

Die Interaktion mit DNA-Reparaturkomplexen könnte ein weiterer Mechanismus sein, über den c-Myc und Miz-1 die genetische Integrität der DNA regulieren. Eine fehlerhafte Regulation dieser Interaktionen könnte zu genomischer Instabilität führen, die Zellzykluskontrolle beeinflussen und ein wichtiger Faktor bei der Tumorentstehung sein.

4.2.7 Faktoren anderer zellulärer Mechanismen

Es konnten viele weitere Untereinheiten von Komplexen identifiziert werden, die mit c-Myc bzw. Miz-1 unterschiedliche Funktionen bei verschiedenen zellulären Vorgängen ausüben könnten.

Erstens konnten Faktoren identifiziert werden, die bei der Proteindegradation eine Rolle spielen könnten. PPP1, eine Protein-Phosphatase, die Ubiquitin-Ligase UBE2O und die ubiquitin-spezifische Protease USP7 könnten am Abbau von c-Myc oder Miz-1 beteiligt sein. Ubiquitin-Ligasen und Ubiquitin-spezifische Proteasen sind Antagonisten im proteasomalen Abbau³²⁸. Posttranslationale Modifizierungen, besonders Phosphorylierungen, spielen eine entscheidende Rolle bei der Proteolyse, der transkriptionellen Aktivität und den biologischen Funktionen von c-Myc²⁹. c-Myc ist ein Protein mit einer kurzen Halbwertszeit von 15-30 min.²⁰². Sein Abbau, eingeleitet durch die Ubiquitinierung mit nachfolgender Degradation durch das Proteasom, wird über den Phosphorylierungsstatus von Ser62 und Thr58 in MB I reguliert. Thr58 wird durch das F-Box Protein Fbw7 erkannt. Der Scf-Fbw7-Ubiquitin-Ligase Komplex steuert den Abbau von c-Myc durch das 26S Proteasom³⁴. Kürzlich konnte die Ubiquitin-spezifische Protease USP28 als Antagonist des Scf-Fbw7-Ubiquitin-Ligase Komplexes identifiziert werden^{329, 330}. Möglicherweise bilden die drei identifizierten Proteine PPP1, USP7 und UBE2O eine ähnliche funktionelle Einheit im Kontext von c-Myc oder Miz-1 und könnten ähnliche Aufgaben in der Proliferation oder Inhibition der Differenzierung wie USP28 ausführen.

Zweitens wurden in der Fraktionierung eine Reihe von Hitzeschockproteinen und Chaperonen identifiziert, die an der Proteinfaltung beteiligt sind. Hsp70 als Interaktionspartner von Miz-1 und seine möglichen Funktionen wurden bereits beschrieben (s. 4.1.1). Sowohl in der MYC/a als auch in der MIZ/MYC Fraktion konnte Hsp70 identifiziert werden. Außerdem konnte in der vorliegenden Arbeit das Chaperon CCT2 in der MIZ/MYC Fraktion gefunden werden. Koch und Kollegen fanden nicht nur CCT2 als *bona fide* Interaktionspartner von c-Myc, sondern auch

CCT1 und CCT3. Alle 3 Chaperone sind Untereinheiten des T-Komplexes. T-Komplex Proteine (CCT) vermitteln die ATP-abhängige Faltung einer bestimmten Gruppe von Proteinen. Im Fall von Cyclin E unterstützt der T-Komplex die Faltung neu translatierter Proteine in eine Form, die für Cdk2 zugänglich ist^{331,332}. Dies könnte eine Funktion sein, die über eine Interaktion von c-Myc oder Miz-1 gesteuert wird und in der Zellzykluskontrolle eine Rolle spielt. Koch und Kollegen konnten nicht ausschließen, dass die Interaktionen auf Grund von Überexpression durch c-Myc zustande kamen. Im vorliegenden Ansatz wurden weder c-Myc noch Miz-1 überexprimiert, so dass eine physiologische Bedeutung dieser Interaktionen wahrscheinlicher ist. Dennoch sind gerade Chaperone Proteine, die besonders in proliferierenden und transformierten Zellen in großen Mengen exprimiert werden. Sie können auch durch Stress-Signale und Onkogene aktiviert werden.

Drittens wurden Faktoren der Zellstruktur und Zellbewegung gefunden. Hierzu gehören Tubuline, Kinesine, Plektin, Myosin und Dedicator of cytokinesis .

Die Interaktion von c-Myc mit alpha-Tubulin wurde in früheren Studien nachgewiesen. Die N-terminale Domäne von c-Myc interagiert mit Mikrotubuli *in vivo*, die Interaktion von c-Myc mit alpha-Tubulin wurde an den Aminosäureresten 48-153 von c-Myc lokalisiert⁷⁰. Es konnte gezeigt werden, dass natürlich vorkommende c-Myc Varianten aus Burkitt-Lymphom Zelllinien mit Mutationen an Thr58 die Proteinstabilität erhöhten und konstitutiv hyperphosphoryliert waren. Die Rolle von c-Myc bzw. Miz-1 an Prozessen der Proliferation und des Zellwachstums sowie an der Replikation, machen auch eine direkte Verbindung zu Zellteilungsprozessen wahrscheinlich. Genomische Instabilitäten, wie sie nach Überexpression von c-Myc auftreten, könnten mit Interaktionen der an der Mitose beteiligten Komplexe, wie den Kinetochoren oder dem Spindelapparat, zusammen hängen. Wenn c-Myc bzw. Miz-1 an der Segregation der Chromosomen bei der Zellteilung direkt beteiligt sind, wäre dies eine Erklärung für veränderte Karyotypen oder Mutationen bei der Deregulation von c-Myc.

Die biologische Rolle weiterer in der vorliegenden Arbeit identifizierter potentieller Interaktoren von c-Myc bzw. Miz-1 muss in nachfolgenden Untersuchungen geklärt werden. Die große Zahl der *bona fide* Interaktionen lässt vermuten, dass Protein-Protein Interaktionen nicht einzeln auftreten, sondern dass wahrscheinlich jedes Protein eine Vielzahl von Interaktionen eingeht. Damit stellt das Interaktom eine weitere Ebene dar, die erklärt, wie aus den relativ wenigen Genen z. B.

des menschlichen Genoms, ein funktionierender Organismus mit viel größerer Komplexität entsteht, als die Anzahl der Gene vermuten ließe.

4.2.8 Methodische Bewertung

Aus allen Fraktionen, die massenspektrometrisch untersucht wurden, konnten 171 unterschiedliche Proteine identifiziert werden. Die beiden identischen Fraktionen MYC/a und MYC/b enthielten 82 unterschiedliche Proteine, 31 (38%) Proteine konnten in beiden Fraktionen nachgewiesen werden. Die MIZ/MYC Fraktion enthielt 117 unterschiedliche Proteine, 27 davon kamen auch in den beiden MYC Fraktionen vor. Chd4, Chd5, erythropoietin 4 immediate early response, DHX16, SnrpD1, SnrpA, SnrpG, Kif3A, eukaryotic translation initiation factor 1 & 2, ANKHD1 und KIAA1984 kamen in allen drei Fraktionen vor.

Die Tatsache, dass nur etwa 38% der Proteinidentifizierungen in zwei gleichen Experimenten durch die LC-MS/MS reproduzierbar waren, legt die Vermutung nahe, dass es sich bei einigen der identifizierten Proteine um falsch-positive Ergebnisse handelt. Schwankungen in den MS-Messungen sind hierfür eine wahrscheinliche Ursache. Bei Wiederholungen dieser oder ähnlicher Experimente sollte darauf geachtet werden, dass jedes LC-MS/MS Experiment mindestens fünfmal reproduziert wird²⁷⁰, um eine ausreichende statistische Signifikanz der Ergebnisse zu erreichen.

Neben falsch positiven Ergebnissen traten auch falsch negative Ergebnisse auf: Die Identifizierung von c-Myc und Miz-1 selbst, wäre bei den LC-MS/MS Messungen zu erwarten gewesen. Daneben fehlten auch viele der schon bekannten Interaktionspartner von c-Myc, wie z. B. Max. Eine mögliche Erklärung solcher falsch negativer Ergebnisse liegt in der zu geringen Empfindlichkeit der LC-MS/MS Methode. Eventuell lagen die c-Myc bzw. Miz-1 Konzentrationen unter der Nachweisgrenze der MS. Eine andere Möglichkeit ist eine zu hohe Komplexität der Probe, so dass Signale anderer Proteine die Signale von c-Myc und Miz-1 überlagerten. Um eine Schätzung der Anzahl der in den Fraktionen enthaltenen Proteine zu erhalten, sollten in zukünftigen Experimenten 2D Gel-Elektrophoresen mit den Proteingemischen aus den Fraktionen durchgeführt werden.

Zwei Studien zur Identifizierung der Interaktionspartner von c-Myc wurden von Koch *et al.*²⁸⁴ und Ewing *et al.*²⁸⁵, wie bereits erwähnt, kürzlich veröffentlicht.

Koch und Kollegen nutzten die TAP Methode in Kombination mit einer neuen multidimensionalen Protein-Identifizierungstechnologie (MuPIT), um Interaktionspartner von c-Myc zu identifizieren²⁸⁴. Die Tandem-Affinitäts-Chromatographie wurde in gleicher Weise wie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Zur massenspektrometrischen Identifizierung wurde eine Kaskade von 2maliger Flüssigchromatographie und nachfolgender Massenspektroskopie verwendet.

Koch und Kollegen verglichen je drei Aufreinigungen von a) transienttransfizierten HEK293T Zellen und b) stabil transfizierten DLD1-tA Zelllinien. Als Kontrolle diente jeweils ein Vektor, der nur den TAP „tag“ enthielt. Koch *et al.* konnten 221 verschiedene Proteine identifizieren, die mit c-Myc interagieren, davon 16 bereits bekannte Interaktionspartner, unter anderen Max, Tip48, Tip49 und TRRAP. In der vorliegenden Arbeit konnten 17 bereits beschriebene Interaktionen detektiert werden. Allerdings wurden nur wenige der „klassischen“ Interaktionspartner nachgewiesen. Eine wahrscheinliche Ursache hierfür ist, dass durch die Fraktionierung eben jene Komplexe mit den bekannten Interaktionspartnern in anderen als den analysierten Fraktionen zu finden sind. Eine Analyse der Fraktionen selbst, etwa durch einen Western Blot gegen Max, Tip48, Tip49 oder TRRAP könnte Aufschluss über diese Vermutung bringen. Eine weitere Möglichkeit, warum einige der bekannten Interaktionen nicht detektiert wurden, könnte die Dissoziation der Komplexe unter den Säulenbedingungen sein.

Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit wurden in den Arbeiten von Ewing *et al.* und Koch *et al.* potentielle Interaktionspartner von c-Myc aus vielen verschiedenen zellulären Kontexten gefunden, bei denen eine Mitwirkung von c-Myc bisher unbekannt war. Die 221 Interaktionen bei Koch *et al.* unterteilten sich funktional in die folgenden Untergruppen: Transkription/Chromatin (25 Proteine), basale Faktoren der RNA PolIII Transkriptionsmaschinerie (4), RNA Prozessierung (23), DNA-Replikation/Chromosomenmetabolismus (12), Proteinsynthese (11), Proteindegradation (26), Proteinmodifikation (16), Proteinfaltung (13), Signaltransduktion (10), Zellstruktur und Transport (35), Metabolismus (26) und Verschiedene (12). Alle drei Arbeiten zeigen keinen hohen Übereinstimmungsgrad an identifizierten Proteinen. Entweder ist das Interaktom von c-Myc wesentlich komplexer als die Ergebnisse der Arbeiten, welche dann als komplementär zu bewerten wären; oder jede der verwendeten Methoden hat zu einer großen Anzahl falsch positiver Ergebnisse geführt.

Vergleicht man die vorliegende Arbeit methodologisch mit der von Koch *et al.* lassen sich einige Limitierungen und Stärken beider Methoden aufzeigen. Erstens führt eine Anreicherung über chromatographische Fraktionierungen nicht in dem Maße zu einer Abtrennung von nicht relevanten Komplexen oder Kontaminanten wie eine Tandem-Affinitäts-Aufreinigung. Im Falle der Fraktionierung darf davon ausgegangen werden, dass auch Komplexe gereinigt und angereichert wurden, die weder c-Myc noch Miz-1 enthielten, da ein spezifisches Herausfiltern dieser Komplexe nicht stattfand. Es ist vielmehr anzunehmen, dass durch die chromatographische Fraktionierung Komplexe ähnlicher Größe und ähnlicher biochemischer Eigenschaften mit c-Myc bzw. Miz-1 kofraktionierten. Das heißt, die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Proteine können zwar als Komponenten größerer Proteinkomplexe, nicht aber als spezifische Interaktionspartner von c-Myc oder Miz-1 beschrieben werden.

Zweitens konnten Koch *et al.* durch die Verwendung transienter und stabiler Transfektionen c-Myc und damit wahrscheinlich auch c-Myc haltige Komplexe in höherem Maße relativ zu unspezifischen Komplexen aufreinigen. Durch die Überexpression des c-Myc Zielproteins war die massenspektrometrische Identifizierung allein durch die Proteinmenge erleichtert. In der vorliegenden Arbeit ist nach der Fraktionierung eine massenspektrometrische Identifizierung von c-Myc, Miz-1 oder des vermutlich in Trikomplexen enthaltenen Max Proteins nicht gelungen. Koch und Kollegen hingegen konnten in jeder chromatographischen Aufreinigung mit nachfolgender Massenspektrometrie c-Myc, Max, TRRAP und Tip49 detektieren. Die extreme Überexpression von c-Myc hat wahrscheinlich unphysiologische Effekte zur Folge, eine dadurch begründete Artefakt-Interaktion kann von Koch *et al.* nicht ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine ähnlich transformierte Zelllinie (HEK293T), die aber c-Myc nicht ektopisch überexprimiert, sondern in physiologischen Mengen enthält, verwendet. Wenn es sich auch um eine transformativ veränderte Zelllinie handelt, ist davon auszugehen, dass c-Myc in wesentlich geringeren Mengen in den Zellen vorkommt. Zum einen erklärt dies, dass der massenspektrometrische Nachweis von c-Myc nicht gelang, zum anderen kann aber auch davon ausgegangen werden, dass die nachgewiesenen Komplexkomponenten nicht durch eine unphysiologische Überexpression zustande kamen.

Trotz der vorhandenen methodischen Limitierungen können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, besonders im Vergleich mit anderen Arbeiten, genutzt werden,

um neue Hypothesen über die Funktionen der c-Myc und Miz-1 Proteine und deren Mechanismen zu generieren. Vor allem die Möglichkeit neuer Funktionen in bisher nicht bekannten zellulären Kontexten konnte unterstrichen werden. Zum einen sollten zukünftige Arbeiten die bisher gefundenen Interaktionen bestätigen, zum anderen ist der Einsatz verbesserter methodischer Ansätze entscheidend, um das vollständige Interaktom von c-Myc und Miz-1 zu entschlüsseln.

4.2.9 Fraktionierung: Schlussfolgerung und Ausblick

Mit der Kopplung von chromatographischer Fraktionierung und anschließender LC-MS/MS konnten über 150 potentielle Interaktionspartner von c-Myc und Miz-1 identifiziert werden. Beide Proteine treten in Multiproteinkomplexen mit über 1.000 kDa auf. Die Zusammensetzung der Komplexe, die in zukünftigen Experimenten bestätigt werden müssen, lässt auf Funktionen von c-Myc und Miz-1 schließen, die über die Regulation der Transkription hinausgehen. Hierzu gehören z. B. die RNA Prozessierung und die Cytokinese.

Methodische Erweiterungen der Fraktionierung können bei der Darstellung der Interaktome von c-Myc und Miz-1 sowohl die Validität als auch die Vollständigkeit optimieren. Ein möglicher Ansatz ist die Kopplung von Affinitäts-Aufreinigung und Fraktionierung. So könnte der Fraktionierung eine Präzipitation von Komplexen mit c-Myc oder Miz-1 Antikörpern vorangestellt oder aber der Fraktionierung eine Affinitäts-Aufreinigung nachgestellt werden. Beide Vorgehensweisen würden die Spezifität der gefundenen Interaktionen beträchtlich erhöhen.

5 Zusammenfassung

Das Proto-Onkogen *c-myc* ist durch seine Funktion als Transkriptionsfaktor entscheidend an vielen Prozessen beteiligt, welche die zelluläre Homöostase aufrechterhalten. Wegen seiner Rolle als Aktivator und Repressor vieler Gene, führt die Deregulation der Expression von c-Myc auch zur Deregulation physiologischer Prozesse wie Zellzykluskontrolle, Zellwachstum oder Apoptose und begünstigt die Tumorentstehung. Wie die meisten Proteine kann auch c-Myc seine Funktion nur durch Interaktion mit anderen Polypeptiden in Multiproteinkomplexen ausüben. Ein wichtiger Interaktionspartner von c-Myc ist Miz-1. Durch Bindung an DNA kann Miz-1 Gene aktivieren. c-Myc reprimiert die Aktivierung durch Miz-1, indem es an Miz-1 bindet. Der genaue Mechanismus dieser Repression ist jedoch unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei experimentelle Ansätze zur Identifizierung von möglichen Interaktionspartnern von c-Myc und Miz-1 etabliert. Eine Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (TAP), um Protein-Protein Wechselwirkungen des Miz-1 Proteins zu identifizieren und eine chromatographische Fraktionierung, um Komplexe mit c-Myc bzw. Miz-1 als Untereinheiten zu identifizieren.

In beiden Ansätzen erfolgte die Identifizierung durch Massenspektroskopie. Mit der Tandem-Affinitäts-Aufreinigung gelang zum einen die Identifizierung des Hitzchockproteins Hsp70 als potentieller Interaktionspartner. Zum anderen konnten drei verschiedene Varianten von Miz-1 mit der TAP Methode gefunden werden.

Die Fraktionierung lieferte eine Liste mit 171 verschiedenen potentiellen Bindungspartnern von c-Myc bzw. Miz-1. Es konnten Proteine aus der Transkription, RNA Prozessierung, DNA-Reparatur, der Proteinmodifikation und-degradation, der Zellstruktur, des Metabolismus und der Proteinsynthese identifiziert werden.

Die Ergebnisse der Arbeit liefern eine Grundlage für die weitere Untersuchung der Funktion von c-Myc und Miz-1. Dies gilt aber nicht nur für den schon bekannten Kontext der Transkription. c-Myc und Miz-1 sind vermutlich an einer Reihe weiterer Prozesse beteiligt, die für die Tumorigenese eine entscheidende Rolle spielen könnten.

6 Literatur

1. Hanahan, D. & Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57-70 (2000).
2. Adhikary, S. & Eilers, M. Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 635-45 (2005).
3. Schwab, M. et al. *myc* consequent to amplification of DNA may contribute to malignant progression of neuroblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 4940-4945 (1984).
4. Seeger, R.C. et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *N Engl J Med* **313**, 1111-6 (1985).
5. Nau, M.M. et al. L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. *Nature* **318**, 69-73 (1985).
6. Roussel, M. et al. Three new types of viral oncogene of cellular origin specific for haematopoietic cell transformation. *Nature* **281**, 452-455 (1979).
7. Davis, A.C., Wims, M., Spotts, G.D., Hann, S.R. & Bradley, A. *myc* mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. *Genes Dev.* **7**, 671-682 (1993).
8. Henriksson, M. & Lüscher, B. Proteins of the Myc network: Essential regulators of cell growth and differentiation. *Cancer Research* **68**, 109-182 (1996).
9. Gallant, P., Shiio, Y., Cheng, P.F., Parkhurst, S.M. & Eisenman, R.N. Myc and Max homologs in *Drosophila*. *Science* **274**, 1523-7 Issn: 0036-8075 (1996).
10. Adams, J.M. et al. *myc* oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* **318**, 533-538 (1985).
11. Taub, R. et al. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 7837-7841 (1982).
12. Jenkins, R.B., Qian, J., Lieber, M.M. & Bostwick, D.G. Detection of c-myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* **57**, 524-31 (1997).
13. Nupponen, N.N., Kakkola, L., Koivisto, P. & Visakorpi, T. Genetic alterations in hormone-refractory recurrent prostate carcinomas. *Am J Pathol* **153**, 141-8 (1998).
14. Erisman, M.D. et al. Deregulation of c-myc gene expression in human colon carcinoma is not accompanied by amplification or rearrangement of the gene. *Mol Cell Biol* **5**, 1969-76 (1985).
15. Yang, J.L., Ow, K.T., Russell, P.J., Ham, J.M. & Crowe, P.J. Higher expression of oncoproteins c-myc, c-erb B-2/neu, PCNA, and p53 in metastasizing colorectal cancer than in nonmetastasizing tumors. *Ann Surg Oncol* **3**, 574-9 (1996).
16. Grover, R., Ross, D.A., Wilson, G.D. & Sanders, R. Measurement of c-myc oncoprotein provides an independent prognostic marker for regional metastatic melanoma. *Br J Plast Surg* **50**, 478-82 (1997).
17. Chana, J.S., Cree, I.A., Foss, A.J., Hungerford, J.L. & Wilson, G.D. The prognostic significance of c-myc oncogene expression in uveal melanoma. *Melanoma Res* **8**, 139-44 (1998).
18. Varley, J.M., Swallow, J.E., Brammar, W.J., Whittaker, J.L. & Walker, R.A. Alterations to either c-erbB-2(neu) or c-myc proto-oncogenes in breast

- carcinomas correlate with poor short-term prognosis. *Oncogene* **1**, 423-30 (1987).
19. Liao, D.J. & Dickson, R.B. c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **7**, 143-64 (2000).
 20. He, T.C. et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* **281**, 1509-12 (1998).
 21. van de Wetering, M. et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* **111**, 241-50 (2002).
 22. Sansom, O.J. et al. Myc deletion rescues Apc deficiency in the small intestine. *Nature* **446**, 676-9 (2007).
 23. Abrams, H.D., Rohrschneider, L.R. & Eisenman, R.N. Nuclear location of the putative transforming protein of avian myelocytomatosis virus. *Cell* **29**, 427-439 (1982).
 24. Hann, S.R., Thompson, C.B. & Eisenman, R.E. c-myc oncogene protein synthesis is independent of the cell cycle in human and avian cells. *Nature* **314**, 366-369 (1985).
 25. Almendral, J.M. et al. Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 2140-2148 (1988).
 26. Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D. & Leder, P. Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* **35**, 603-610 (1983).
 27. Spotts, G.D., Patel, S.V., Xiao, Q. & Hann, S.R. Identification of downstream-initiated c-Myc proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full-length c-Myc proteins. *Mol Cell Biol* **17**, 1459-1468 (1997).
 28. Kato, G.J., Barrett, J., Villa-Garcia, M. & Dang, C.V. An amino-terminal c-myc domain required for neoplastic transformation activates transcription. *Mol. Cell. Biol.* **10**, 5914-5920 (1990).
 29. Hann, S.R. Role of post-translational modifications in regulating c-Myc proteolysis, transcriptional activity and biological function. *Semin Cancer Biol* **16**, 288-302 (2006).
 30. Sears, R. et al. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev* **14**, 2501-14 (2000).
 31. Yeh, E. et al. A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol* **6**, 308-18 (2004).
 32. Gregory, M.A., Qi, Y. & Hann, S.R. Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization. *J Biol Chem* **278**, 51606-12 (2003).
 33. Welcker, M., Orian, A., Grim, J.E., Eisenman, R.N. & Clurman, B.E. A nucleolar isoform of the Fbw7 ubiquitin ligase regulates c-Myc and cell size. *Curr Biol* **14**, 1852-7 (2004).
 34. Welcker, M. et al. The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9085-90 (2004).
 35. Yada, M. et al. Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *Embo J* **23**, 2116-25 (2004).
 36. Bahram, F., von der Lehr, N., Cetinkaya, C. & Larsson, L.G. c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover. *Blood* **95**, 2104-10 (2000).

37. Herbst, A. et al. A conserved element in Myc that negatively regulates its proapoptotic activity. *EMBO Rep* **6**, 177-83 (2005).
38. Cowling, V.H., Chandriani, S., Whitfield, M.L. & Cole, M.D. A conserved Myc protein domain, MBIV, regulates DNA binding, apoptosis, transformation, and G2 arrest. *Mol Cell Biol* **26**, 4226-39 (2006).
39. Murre, C., SchonleberMcCaw, P. & Baltimore, D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* **56**, 777-783 (1989).
40. Landschulz, W.H., Johnson, P.F. & McKnight, S.L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**, 1759-1764 (1988).
41. Prendergast, G.C. & Ziff, E.B. Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-myc basic region. *Science* **251**, 186-189 (1991).
42. Blackwood, E.M. & Eisenman, R.N. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. *Science* **251**, 1211-7 (1991).
43. Nair, S.K. & Burley, S.K. X-ray structures of Myc-Max and Mad-Max recognizing DNA. Molecular bases of regulation by proto-oncogenic transcription factors. *Cell* **112**, 193-205 (2003).
44. Sakamuro, D. & Prendergast, G.C. New Myc-interacting proteins: a second Myc network emerges. *Oncogene* **18**, 2942-54 (1999).
45. Peukert, K. et al. An alternative pathway for gene regulation by Myc. *Embo J* **16**, 5672-86 (1997).
46. Roy, A.L., Carruthers, C., Gutjahr, T. & Roeder, R.G. Direct role for Myc in transcription initiation mediated by interactions with TFII-I. *Nature* **365**, 359-61 (1993).
47. Shrivastava, A. et al. Inhibition of transcriptional regulator Yin-Yang-1 by association with c-Myc. *Science* **262**, 1889-92 (1993).
48. Shrivastava, A. & Calame, K. An analysis of genes regulated by the multi-functional transcriptional regulator Yin Yang-1. *Nucleic Acids Res* **22**, 5151-5 (1994).
49. Shrivastava, A., Yu, J., Artandi, S. & Calame, K. YY1 and c-Myc associate in vivo in a manner that depends on c-Myc levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10638-41 (1996).
50. Austen, M., Cerni, C., Luscher-Firzlauff, J.M. & Luscher, B. YY1 can inhibit c-Myc function through a mechanism requiring DNA binding of YY1 but neither its transactivation domain nor direct interaction with c-Myc. *Oncogene* **17**, 511-20 (1998).
51. Gaubatz, S. et al. Transcriptional activation by Myc is under negative control by the transcription factor AP-2. *Embo J* **14**, 1508-19 (1995).
52. Veldman, T., Liu, X., Yuan, H. & Schlegel, R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8211-6 (2003).
53. Kitaura, H. et al. Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and p21(cip1/waf1/sdi1) in DNA replication and transcription. *J Biol Chem* **275**, 10477-83 (2000).
54. Vervoorts, J. et al. Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. *EMBO Rep* **4**, 484-90 (2003).

55. Cheng, S.W. et al. c-MYC interacts with INI1/hSNF5 and requires the SWI/SNF complex for transactivation function. *Nat Genet* **22**, 102-5 (1999).
56. Frank, S.R. et al. MYC recruits the TIP60 histone acetyltransferase complex to chromatin. *EMBO Rep* **4**, 575-80 (2003).
57. Taira, T. et al. AMY-1, a novel C-MYC binding protein that stimulates transcription activity of C-MYC. *Genes Cells* **3**, 549-65 (1998).
58. von der Lehr, N. et al. The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteosomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription. *Mol Cell* **11**, 1189-200 (2003).
59. Mori, K. et al. MM-1, a novel c-Myc-associating protein that represses transcriptional activity of c-Myc. *J Biol Chem* **273**, 29794-800 (1998).
60. Hennemann, H., Vassen, L., Geisen, C., Eilers, M. & Moroy, T. Identification of a novel Kruppel-associated box domain protein, Krim-1, that interacts with c-Myc and inhibits its oncogenic activity. *J Biol Chem* **278**, 28799-811 (2003).
61. McMahon, S.B., Van Buskirk, H.A., Dugan, K.A., Copeland, T.D. & Cole, M.D. The novel ATM-related protein TRRAP is an essential cofactor for the c-Myc and E2F oncoproteins. *Cell* **94**, 363-74 (1998).
62. Madge, B., Geisen, C., Moroy, T. & Schwab, M. Yaf2 inhibits Myc biological function. *Cancer Lett* **193**, 171-6 (2003).
63. Alexandrov, I., Shlyakhova, L., Vartanian, A., Zajac-Kaye, M. & Alexandrova, N. c-Raf kinase binds to N-terminal domain of c-Myc. *FEBS Lett* **414**, 465-70 (1997).
64. Liu, X., Tesfai, J., Evrard, Y.A., Dent, S.Y. & Martinez, E. c-Myc transformation domain recruits the human STAGA complex and requires TRRAP and GCN5 acetylase activity for transcription activation. *J Biol Chem* **278**, 20405-12 (2003).
65. Zhou, C. & Liu, J. Inhibition of human telomerase reverse transcriptase gene expression by BRCA1 in human ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 130-6 (2003).
66. Thorgeirsson, S.S. & Santoni-Rugiu, E. Transgenic mouse models in carcinogenesis: interaction of c-myc with transforming growth factor alpha and hepatocyte growth factor in hepatocarcinogenesis. *Br J Clin Pharmacol* **42**, 43-52 (1996).
67. Carystinos, G.D., Kandouz, M., Alaoui-Jamali, M.A. & Batist, G. Unexpected induction of the human connexin 43 promoter by the ras signaling pathway is mediated by a novel putative promoter sequence. *Mol Pharmacol* **63**, 821-31 (2003).
68. Bao, J. & Zervos, A.S. Isolation and characterization of Nmi, a novel partner of Myc proteins. *Oncogene* **12**, 2171-6 (1996).
69. Mahon, G.M. et al. The c-Myc Oncoprotein Interacts with Bcr. *Curr Biol* **13**, 437-41 (2003).
70. Alexandrova, N. et al. The N-terminal domain of c-Myc associates with alpha-tubulin and microtubules in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* **15**, 5188-95 (1995).
71. Mac Partlin, M. et al. Interactions of the DNA mismatch repair proteins MLH1 and MSH2 with c-MYC and MAX. *Oncogene* **22**, 819-25 (2003).
72. Auvinen, M. et al. Transcriptional regulation of the ornithine decarboxylase gene by c-Myc/Max/Mad network and retinoblastoma protein interacting with c-Myc. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 496-521 (2003).

73. Brough, D.E., Hofmann, T.J., Ellwood, K.B., Townley, R.A. & Cole, M.D. An essential domain of the c-myc protein interacts with a nuclear factor that is also required for E1A-mediated transformation. *Mol Cell Biol* **15**, 1536-44 (1995).
74. Otsuki, Y. et al. Guanine nucleotide exchange factor, Tiam1, directly binds to c-Myc and interferes with c-Myc-mediated apoptosis in rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem* **278**, 5132-40 (2003).
75. Gupta, S. & Davis, R.J. MAP kinase binds to the NH2-terminal activation domain of c-Myc. *FEBS Lett* **353**, 281-5 (1994).
76. Sakamuro, D., Elliott, K.J., Wechsler-Reya, R. & Prendergast, G.C. BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nat Genet* **14**, 69-77 (1996).
77. Beijersbergen, R.L., Hijmans, E.M., Zhu, L. & Bernards, R. Interaction of c-Myc with the pRb-related protein p107 results in inhibition of c-Myc-mediated transactivation. *Embo J* **13**, 4080-6 (1994).
78. Mu, Z.M., Yin, X.Y. & Prochownik, E.V. Pag, a putative tumor suppressor, interacts with the Myc Box II domain of c-Myc and selectively alters its biological function and target gene expression. *J Biol Chem* **277**, 43175-84 (2002).
79. Singh, I.S., Luo, Z., Kozlowski, M.T. & Erlichman, J. Association of USF and c-Myc with a helix-loop-helix-consensus motif in the core promoter of the murine type II beta regulatory subunit gene of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase. *Mol Endocrinol* **8**, 1163-74 (1994).
80. Eberhardy, S.R. & Farnham, P.J. Myc recruits P-TEFb to mediate the final step in the transcriptional activation of the cad promoter. *J Biol Chem* **277**, 40156-62 (2002).
81. Maheswaran, S., Lee, H. & Sonenshein, G.E. Intracellular association of the protein product of the c-myc oncogene with the TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* **14**, 1147-52 (1994).
82. Taira, T. et al. Cell cycle-dependent switch of up-and down-regulation of human hsp70 gene expression by interaction between c-Myc and CBF/NF-Y. *J Biol Chem* **274**, 24270-9 (1999).
83. Izumi, H. et al. Mechanism for the transcriptional repression by c-Myc on PDGF beta-receptor. *J Cell Sci* **114**, 1533-44 (2001).
84. Hateboer, G. et al. TATA-binding protein and the retinoblastoma gene product bind to overlapping epitopes on c-Myc and adenovirus E1A protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8489-93 (1993).
85. Channavajhala, P. & Seldin, D.C. Functional interaction of protein kinase CK2 and c-Myc in lymphomagenesis. *Oncogene* **21**, 5280-8 (2002).
86. Uramoto, H. et al. p73 Interacts with c-Myc to regulate Y-box-binding protein-1 expression. *J Biol Chem* **277**, 31694-702 (2002).
87. Wang, Y.W., Chang, H.S., Lin, C.H. & Yu, W.C. HPV-18 E7 conjugates to c-Myc and mediates its transcriptional activity. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 402-12 (2007).
88. Guo, Q., Xie, J., Dang, C.V., Liu, E.T. & Bishop, J.M. Identification of a large Myc-binding protein that contains RCC1-like repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9172-7 (1998).
89. Seoane, J. et al. TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol* **3**, 400-8 (2001).
90. Brenner, C. et al. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *Embo J* **24**, 336-46 (2005).

91. Gartel, A.L. et al. Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4510-5 (2001).
92. Koshiji, M. et al. HIF-1alpha induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *Embo J* **23**, 1949-56 (2004).
93. Takayama, M.A., Taira, T., Tamai, K., Iguchi-Ariga, S.M. & Ariga, H. ORC1 interacts with c-Myc to inhibit E-box-dependent transcription by abrogating c-Myc-SNF5/INI1 interaction. *Genes Cells* **5**, 481-90 (2000).
94. Satou, A., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M. & Ariga, H. A novel transrepression pathway of c-Myc. Recruitment of a transcriptional corepressor complex to c-Myc by MM-1, a c-Myc-binding protein. *J Biol Chem* **276**, 46562-7 (2001).
95. Takayama, M., Taira, T., Iguchi-Ariga, S.M. & Ariga, H. CDC6 interacts with c-Myc to inhibit E-box-dependent transcription by abrogating c-Myc/Max complex. *FEBS Lett* **477**, 43-8 (2000).
96. Park, J., Wood, M.A. & Cole, M.D. BAF53 forms distinct nuclear complexes and functions as a critical c-Myc-interacting nuclear cofactor for oncogenic transformation. *Mol Cell Biol* **22**, 1307-16 (2002).
97. Chapman, N.R. et al. A novel form of the RelA nuclear factor kappaB subunit is induced by and forms a complex with the proto-oncogene c-Myc. *Biochem J* **366**, 459-69 (2002).
98. Tinel, M. et al. Downregulation of cytochromes P450 in growth-stimulated rat hepatocytes: role of c-Myc induction and impaired C/EBP binding to DNA. *J Hepatol* **39**, 171-8 (2003).
99. Yu, M. et al. PARP-10, a novel Myc-interacting protein with poly(ADP-ribose) polymerase activity, inhibits transformation. *Oncogene* **24**, 1982-93 (2005).
100. Cairo, S. et al. PML interacts with Myc, and Myc target gene expression is altered in PML-null fibroblasts. *Oncogene* **24**, 2195-203 (2005).
101. Grandori, C. et al. c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol* **7**, 311-8 (2005).
102. Noguchi, K. et al. Regulation of c-Myc through phosphorylation at Ser-62 and Ser-71 by c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* **274**, 32580-7 (1999).
103. Cheng, A.S. et al. Combinatorial analysis of transcription factor partners reveals recruitment of c-MYC to estrogen receptor-alpha responsive promoters. *Mol Cell* **21**, 393-404 (2006).
104. Feng, X.H., Liang, Y.Y., Liang, M., Zhai, W. & Lin, X. Direct interaction of c-Myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGF-beta-mediated induction of the CDK inhibitor p15(Ink4B). *Mol Cell* **9**, 133-43 (2002).
105. Seth, A., Alvarez, E., Gupta, S. & Davis, R.J. A phosphorylation site located in the NH2-terminal domain of c-Myc increases transactivation of gene expression. *J Biol Chem* **266**, 23521-4 (1991).
106. English, J.M., Pearson, G., Baer, R. & Cobb, M.H. Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases. *J Biol Chem* **273**, 3854-60 (1998).
107. Alvarez, E. et al. Pro-Leu-Ser/Thr-Pro is a consensus primary sequence for substrate protein phosphorylation. Characterization of the phosphorylation of c-myc and c-jun proteins by an epidermal growth factor receptor threonine 669 protein kinase. *J Biol Chem* **266**, 15277-85 (1991).
108. Fukunaga, R. & Hunter, T. MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *Embo J* **16**, 1921-33 (1997).

109. Smith, E., Coetzee, G.A. & Frenkel, B. Glucocorticoids inhibit cell cycle progression in differentiating osteoblasts via glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem* **277**, 18191-7 (2002).
110. Wei, W., Jin, J., Schlisio, S., Harper, J.W. & Kaelin, W.G., Jr. The v-Jun point mutation allows c-Jun to escape GSK3-dependent recognition and destruction by the Fbw7 ubiquitin ligase. *Cancer Cell* **8**, 25-33 (2005).
111. McEwan, I.J., Dahlman-Wright, K., Ford, J. & Wright, A.P. Functional interaction of the c-Myc transactivation domain with the TATA binding protein: evidence for an induced fit model of transactivation domain folding. *Biochemistry* **35**, 9584-93 (1996).
112. Qi, Y. et al. p19ARF directly and differentially controls the functions of c-Myc independently of p53. *Nature* **431**, 712-7 (2004).
113. Wang, Q., Zhang, H., Kajino, K. & Greene, M.I. BRCA1 binds c-Myc and inhibits its transcriptional and transforming activity in cells. *Oncogene* **17**, 1939-48 (1998).
114. Bannasch, D., Weis, I. & Schwab, M. Nmi protein interacts with regions that differ between MycN and Myc and is localized in the cytoplasm of neuroblastoma cells in contrast to nuclear MycN. *Oncogene* **18**, 6810-7 (1999).
115. Li, H., Lee, T.H. & Avraham, H. A novel tricomplex of BRCA1, Nmi, and c-Myc inhibits c-Myc-induced human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) promoter activity in breast cancer. *J Biol Chem* **277**, 20965-73 (2002).
116. Bouchard, C. et al. Regulation of cyclin D2 gene expression by the Myc/Max/Mad network: Myc-dependent TRRAP recruitment and histone acetylation at the cyclin D2 promoter. *Genes Dev* **15**, 2042-7 (2001).
117. Wood, M.A., McMahon, S.B. & Cole, M.D. An ATPase/helicase complex is an essential cofactor for oncogenic transformation by c-Myc. *Mol Cell* **5**, 321-30 (2000).
118. Faiola, F. et al. Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription. *Mol Cell Biol* **25**, 10220-34 (2005).
119. Patel, J.H. et al. The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol Cell Biol* **24**, 10826-34 (2004).
120. Fujii, M. et al. SNIP1 is a candidate modifier of the transcriptional activity of c-Myc on E box-dependent target genes. *Mol Cell* **24**, 771-83 (2006).
121. Arabi, A., Rustum, C., Hallberg, E. & Wright, A.P. Accumulation of c-Myc and proteasomes at the nucleoli of cells containing elevated c-Myc protein levels. *J Cell Sci* **116**, 1707-17 (2003).
122. Kim, S.Y., Herbst, A., Tworkowski, K.A., Salghetti, S.E. & Tansey, W.P. Skp2 regulates Myc protein stability and activity. *Mol Cell* **11**, 1177-88 (2003).
123. von der Lehr, N., Johansson, S. & Larsson, L.G. Implication of the ubiquitin/proteasome system in Myc-regulated transcription. *Cell Cycle* **2**, 403-7 (2003).
124. Datta, A. et al. Myc-ARF (alternate reading frame) interaction inhibits the functions of Myc. *J Biol Chem* **279**, 36698-707 (2004).
125. Hann, S.R., Abrams, H.D., Rohrschneider, L.R. & Eisenman, R.N. Proteins encoded by v-myc and c-myc oncogenes: identification and localization in acute leukemia virus transformants and bursal lymphoma cell lines. *Cell* **34**, 789-98 (1983).

126. Sears, R., Leone, G., DeGregori, J. & Nevins, J.R. Ras enhances Myc protein stability. *Mol Cell* **3**, 169-79 (1999).
127. Gregory, M.A. & Hann, S.R. c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Mol Cell Biol* **20**, 2423-35 (2000).
128. Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C. & Reed, S.I. Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell* **102**, 303-14 (2000).
129. Salghetti, S.E., Caudy, A.A., Chenoweth, J.G. & Tansey, W.P. Regulation of transcriptional activation domain function by ubiquitin. *Science* **293**, 1651-3 (2001).
130. Salghetti, S.E., Kim, S.Y. & Tansey, W.P. Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *Embo J* **18**, 717-26 (1999).
131. Adhikary, S. et al. The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell* **123**, 409-21 (2005).
132. Sherr, C.J. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer* **6**, 663-73 (2006).
133. Amente, S. et al. p14ARF directly interacts with Myc through the Myc BoxII domain. *Cancer Biol Ther* **5**, 287-91 (2006).
134. Peukert, K. et al. An alternative pathway for gene regulation by Myc. *Embo J* **16**, 5672-5686 (1997).
135. Bardwell, V.J. & Treisman, R. The POZ domain: A conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev.* **8**, 1664-1677 (1994).
136. Dhordain, P. et al. The BTB/POZ domain targets the LAZ3/BCL6 oncoprotein to nuclear dots and mediates homomerisation in vivo. *Oncogene* **11**, 2689-97 Issn: 0950-9232 (1995).
137. Stead, M.A. et al. A Beta-Sheet Interaction Interface Directs the Tetramerisation of the Miz-1 POZ Domain. *J Mol Biol* (2007).
138. Tommerup, N. & Vissing, H. Isolation and fine mapping of 16 novel human zinc finger-encoding cDNAs identify putative candidate genes for developmental and malignant disorders. *Genomics* **27**, 259-264 (1995).
139. Brodeur, G.M., Sekhon, G. & Goldstein, M.N. Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer* **40**, 2256-63 (1977).
140. Fong, C.T. et al. Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 3753-7 (1989).
141. Ikegaki, N. et al. De novo identification of MIZ-1 (ZBTB17) encoding a MYC-interacting zinc-finger protein as a new favorable neuroblastoma gene. *Clin Cancer Res* **13**, 6001-9 (2007).
142. Adhikary, S. et al. Miz1 is required for early embryonic development during gastrulation. *Mol Cell Biol* **23**, 7648-57 (2003).
143. Herold, S. et al. Negative Regulation of the Mammalian UV Response by Myc through Association with Miz-1. *Mol. Cell.* **10**, 509-21 (2002).
144. Bork, P. et al. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *Faseb J* **11**, 68-76 (1997).
145. Wollmann, Y. et al. The DNA topoisomerase IIbeta binding protein 1 (TopBP1) interacts with poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1). *J Cell Biochem* (2007).

146. de Murcia, J.M. et al. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7303-7 (1997).
147. Wanzel, M. et al. Akt and 14-3-3eta regulate Miz1 to control cell-cycle arrest after DNA damage. *Nat Cell Biol* **7**, 30-41 (2005).
148. Piluso, D., Bilan, P. & Capone, J.P. Host cell factor-1 interacts with and antagonizes transactivation by the cell cycle regulatory factor Miz-1. *J Biol Chem* **277**, 46799-808 (2002).
149. Zhao, N., Wang, J., Cui, Y., Guo, L. & Lu, S.H. Induction of G1 cell cycle arrest and P15INK4b expression by ECRG1 through interaction with Miz-1. *J Cell Biochem* **92**, 65-76 (2004).
150. Phan, R.T., Saito, M., Basso, K., Niu, H. & Dalla-Favera, R. BCL6 interacts with the transcription factor Miz-1 to suppress the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and cell cycle arrest in germinal center B cells. *Nat Immunol* **6**, 1054-60 (2005).
151. Walisko, O. et al. Sleeping Beauty transposase modulates cell-cycle progression through interaction with Miz-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4062-7 (2006).
152. Baudino, T.A. & Cleveland, J.L. The Max network gone mad. *Mol Cell Biol* **21**, 691-702 (2001).
153. Orian, A. et al. Genomic binding by the Drosophila Myc, Max, Mad/Mnt transcription factor network. *Genes Dev* **17**, 1101-14 (2003).
154. Boyd, K.E. & Farnham, P.J. Coexamination of site-specific transcription factor binding and promoter activity in living cells. *Mol Cell Biol* **19**, 8393-9 (1999).
155. Hurlin, P.J., Queva, C. & Eisenman, R.N. Mnt, a novel Max-interacting protein is coexpressed with Myc in proliferating cells and mediates repression at Myc binding sites. *Genes Dev* **11**, 44-58 (1997).
156. Hurlin, P.J. et al. Deletion of Mnt leads to disrupted cell cycle control and tumorigenesis. *Embo J* **22**, 4584-96 (2003).
157. Nilsson, J.A. et al. Mnt loss triggers Myc transcription targets, proliferation, apoptosis, and transformation. *Mol Cell Biol* **24**, 1560-9 (2004).
158. Cowling, V.H. & Cole, M.D. Mechanism of transcriptional activation by the Myc oncoproteins. *Semin Cancer Biol* **16**, 242-52 (2006).
159. Park, J., Kunjibettu, S., McMahon, S.B. & Cole, M.D. The ATM-related domain of TRRAP is required for histone acetyltransferase recruitment and Myc-dependent oncogenesis. *Genes Dev* **15**, 1619-24 (2001).
160. Nikiforov, M.A. et al. TRRAP-dependent and TRRAP-independent transcriptional activation by Myc family oncoproteins. *Mol Cell Biol* **22**, 5054-63 (2002).
161. Grant, P.A., Schieltz, D., Pray-Grant, M.G., Yates, J.R., 3rd & Workman, J.L. The ATM-related cofactor Tra1 is a component of the purified SAGA complex. *Mol Cell* **2**, 863-7 (1998).
162. Ogryzko, V.V. et al. Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. *Cell* **94**, 35-44 (1998).
163. Martinez, E. et al. Human STAGA complex is a chromatin-acetylating transcription coactivator that interacts with pre-mRNA splicing and DNA damage-binding factors in vivo. *Mol Cell Biol* **21**, 6782-95 (2001).
164. Strahl, B.D. & Allis, C.D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41-5 (2000).

165. Bouchard, C. et al. Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* **18**, 5321-33 (1999).
166. Frank, S.R., Schroeder, M., Fernandez, P., Taubert, S. & Amati, B. Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes Dev* **15**, 2069-82 (2001).
167. Xu, D. et al. Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3826-31 (2001).
168. Fuchs, M. et al. The p400 complex is an essential E1A transformation target. *Cell* **106**, 297-307 (2001).
169. Bellosta, P. et al. Myc interacts genetically with Tip48/Reptin and Tip49/Pontin to control growth and proliferation during Drosophila development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11799-804 (2005).
170. Etard, C., Gradl, D., Kunz, M., Eilers, M. & Wedlich, D. Pontin and Reptin regulate cell proliferation in early Xenopus embryos in collaboration with c-Myc and Miz-1. *Mech Dev* **122**, 545-56 (2005).
171. Eberhardy, S.R., D'Cunha, C.A. & Farnham, P.J. Direct examination of histone acetylation on Myc target genes using chromatin immunoprecipitation. *J Biol Chem* **275**, 33798-805 (2000).
172. Eberhardy, S.R. & Farnham, P.J. c-Myc mediates activation of the cad promoter via a post-RNA polymerase II recruitment mechanism. *J Biol Chem* **276**, 48562-71 (2001).
173. Silver, D.P. & Livingston, D.M. Self-excising retroviral vectors encoding the Cre recombinase overcome Cre-mediated cellular toxicity. *Mol Cell* **8**, 233-43 (2001).
174. Grewal, S.S., Li, L., Orian, A., Eisenman, R.N. & Edgar, B.A. Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during Drosophila development. *Nat Cell Biol* **7**, 295-302 (2005).
175. Arabi, A. et al. c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* **7**, 303-10 (2005).
176. Gomez-Roman, N., Grandori, C., Eisenman, R.N. & White, R.J. Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. *Nature* **421**, 290-4 (2003).
177. Poortinga, G. et al. MAD1 and c-MYC regulate UBF and rDNA transcription during granulocyte differentiation. *Embo J* **23**, 3325-35 (2004).
178. Schlosser, I. et al. A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res* **31**, 6148-56 (2003).
179. Boon, K. et al. N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *Embo J* **20**, 1383-93 (2001).
180. Lee, L.A. & Dang, C.V. C-Myc transrepression and cell transformation. *Curr Top Microbiol Immunol* **224**, 131-5 (1997).
181. Marhin, W.W., Chen, S., Facchini, L.M., Fornace, A.J., Jr. & Penn, L.Z. Myc represses the growth arrest gene gadd45. *Oncogene* **14**, 2825-34 (1997).
182. Inghirami, G. et al. Down-regulation of LFA-1 adhesion receptors by C-myc oncogene in human B lymphoblastoid cells. *Science* **250**, 682-6 (1990).
183. Wu, K.J., Polack, A. & Dalla-Favera, R. Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC. *Science* **283**, 676-9 (1999).

184. Coller, H.A. et al. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3260-5 (2000).
185. O'Connell, B.C. et al. A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns. *J Biol Chem* **278**, 12563-73 (2003).
186. Berwanger, B. et al. Loss of a FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma. *Cancer Cell* **2**, 377-86 (2002).
187. Claassen, G.F. & Hann, S.R. A role for transcriptional repression of p21CIP1 by c-Myc in overcoming transforming growth factor beta -induced cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9498-503 (2000).
188. Gartel, A.L. A new mode of transcriptional repression by c-myc: methylation. *Oncogene* **25**, 1989-90 (2006).
189. Herold, S. et al. Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. *Mol Cell* **10**, 509-21 (2002).
190. Seoane, J., Le, H.V. & Massague, J. Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* **419**, 729-34 (2002).
191. Wu, S. et al. Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene* **22**, 351-60 (2003).
192. Yang, W. et al. Repression of transcription of the p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene by c-Myc. *Oncogene* **20**, 1688-702 (2001).
193. Staller, P. et al. Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* **3**, 392-9 (2001).
194. Knoepfler, P.S., Cheng, P.F. & Eisenman, R.N. N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev* **16**, 2699-712 (2002).
195. Dauphinot, L. et al. Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene* **20**, 3258-65 (2001).
196. Freytag, S.O. & Geddes, T.J. Reciprocal regulation of adipogenesis by Myc and C/EBP alpha. *Science* **256**, 379-82 (1992).
197. Li, L., Nerlov, C., Prendergast, G., MacGregor, D. & Ziff, E.B. *in vivo* by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *EMBO J* **13**, 4070-4079 (1994).
198. Amundson, S.A., Zhan, Q., Penn, L.Z. & Fornace, A.J., Jr. Myc suppresses induction of the growth arrest genes gadd34, gadd45, and gadd153 by DNA-damaging agents. *Oncogene* **17**, 2149-54 (1998).
199. Chan, H.M., Narita, M., Lowe, S.W. & Livingston, D.M. The p400 E1A-associated protein is a novel component of the p53 --> p21 senescence pathway. *Genes Dev* **19**, 196-201 (2005).
200. Feng, X.H., Liang, Y.Y., Liang, M., Zhai, W. & Lin, X. Direct interaction of c-Myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGF-beta- mediated induction of the CDK inhibitor p15(Ink4B). *Mol Cell* **9**, 133-43. (2002).
201. Hann, S.R. & Eisenman, R.N. Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Mol Cell Biol* **4**, 2486-97 (1984).
202. Waters, C.M., Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Moore, J.P. & Evan, G.I. c-myc protein expression in untransformed fibroblasts. *Oncogene* **6**, 797-805 (1991).

203. Hermeking, H. et al. Identification of CDK4 as a target of c-MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2229-34 (2000).
204. Steiner, P. et al. Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin/cdk complexes. *Embo J* **14**, 4814-4826 (1995).
205. Vlach, J., Hennecke, S., Alevizopoulos, K., Conti, D. & Amati, B. Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. *Embo J* **15**, 6595-6604 (1996).
206. Muller, D. et al. Cdk2-dependent phosphorylation of p27 facilitates its Myc-induced release from cyclin E/cdk2 complexes. *Oncogene* **15**, 2561-76 (1997).
207. Pagano, M. et al. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* **269**, 682-685 (1995).
208. Vlach, J., Hennecke, S. & Amati, B. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Embo J* **16**, 5334-5344 (1997).
209. Galaktionov, K., Chen, X. & Beach, D. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature* **382**, 511-7 (1996).
210. Perez-Roger, I., Kim, S.H., Griffiths, B., Sewing, A. & Land, H. Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *Embo J* **18**, 5310-20 (1999).
211. O'Hagan, R.C. et al. Myc-enhanced expression of Cull1 promotes ubiquitin-dependent proteolysis and cell cycle progression. *Genes Dev* **14**, 2185-91 (2000).
212. Lasorella, A., Nosedà, M., Beyna, M., Yokota, Y. & Iavarone, A. Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. *Nature* **407**, 592-8 (2000).
213. Amati, B., Alevizopoulos, K. & Vlach, J. Myc and the cell cycle. *Front Biosci* **3**, d250-68 (1998).
214. Elend, M. & Eilers, M. Cell growth: downstream of Myc - to grow or to cycle? *Curr Biol* **9**, R936-8 (1999).
215. Mateyak, M.K., Obaya, A.J., Adachi, S. & Sedivy, J.M. Phenotypes of c-Myc-deficient rat fibroblasts isolated by targeted homologous recombination. *Cell Growth Differ* **8**, 1039-48 (1997).
216. Iritani, B.M. & Eisenman, R.N. c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13180-5 (1999).
217. Schuhmacher, M. et al. Control of cell growth by c-Myc in the absence of cell division. *Curr Biol* **9**, 1255-8 (1999).
218. Johnston, L.A., Prober, D.A., Edgar, B.A., Eisenman, R.N. & Gallant, P. Drosophila myc regulates cellular growth during development. *Cell* **98**, 779-90 (1999).
219. Moreno, E. & Basler, K. dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell* **117**, 117-29 (2004).
220. de la Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P. & Johnston, L.A. Drosophila myc regulates organ size by inducing cell competition. *Cell* **117**, 107-16 (2004).
221. Rosenwald, I.B., Rhoads, D.B., Callanan, L.D., Isselbacher, K.J. & Schmidt, E.V. Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6175-8 (1993).

-
222. Schmidt, E.V. The role of c-myc in regulation of translation initiation. *Oncogene* **23**, 3217-21 (2004).
223. Holt, J.T., Redner, R.L. & Nienhuis, A.W. An oligomer complementary to c-myc mRNA inhibits proliferation of HL-60 promyelocytic cells and induces differentiation. *Mol Cell Biol* **8**, 963-73 (1988).
224. Coppola, J.A. & Cole, M.D. Constitutive c-myc oncogene expression blocks mouse erythroleukaemia cell differentiation but not commitment. *Nature* **320**, 760-3 (1986).
225. Barr, L.F., Campbell, S.E., Bochner, B.S. & Dang, C.V. Association of the decreased expression of alpha3beta1 integrin with the altered cell: environmental interactions and enhanced soft agar cloning ability of c-myc-overexpressing small cell lung cancer cells. *Cancer Res* **58**, 5537-45 (1998).
226. Frye, M., Gardner, C., Li, E.R., Arnold, I. & Watt, F.M. Evidence that Myc activation depletes the epidermal stem cell compartment by modulating adhesive interactions with the local microenvironment. *Development* **130**, 2793-808 (2003).
227. Gebhardt, A. et al. Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. *J Cell Biol* **172**, 139-49 (2006).
228. Janz, A., Seignani, C., Kenyon, K., Ngo, C.V. & Thomas-Tikhonenko, A. Activation of the myc oncoprotein leads to increased turnover of thrombospondin-1 mRNA. *Nucleic Acids Res* **28**, 2268-75 (2000).
229. Baudino, T.A. et al. c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev* **16**, 2530-43 (2002).
230. Pelengaris, S., Littlewood, T., Khan, M., Elia, G. & Evan, G. Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion. *Mol Cell* **3**, 565-77 (1999).
231. Pelengaris, S., Khan, M. & Evan, G.I. Suppression of myc-induced apoptosis in Beta cells exposes multiple oncogenic properties of myc and triggers carcinogenic progression. *Cell* **109**, 321-34. (2002).
232. Howes, K.A. et al. Apoptosis or retinoblastoma: alternative fates of photoreceptors expressing the HPV-16 E7 gene in the presence or absence of p53. *Genes Dev* **8**, 1300-10 Issn: 0890-9369 (1994).
233. Adachi, S. et al. c-Myc is necessary for DNA damage-induced apoptosis in the G(2) phase of the cell cycle. *Mol Cell Biol* **21**, 4929-37 (2001).
234. Phillips, A.C. & Vousden, K.H. E2F-1 induced apoptosis. *Apoptosis* **6**, 173-82 (2001).
235. Breckenridge, D.G. & Shore, G.C. Regulation of apoptosis by E1A and Myc oncoproteins. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **10**, 273-80 (2000).
236. Evan, G.I. et al. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **69**, 119-28 (1992).
237. Drayton, S. et al. Tumor suppressor p16INK4a determines sensitivity of human cells to transformation by cooperating cellular oncogenes. *Cancer Cell* **4**, 301-10 (2003).
238. Harris, A.W. et al. The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells. *J Exp Med* **167**, 353-71 (1988).
239. Lowe, S.W. & Ruley, H.E. Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev* **7**, 535-45 (1993).

-
240. Rao, L. et al. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7742-6 (1992).
241. Qin, X.Q., Livingston, D.M., Kaelin, W.G., Jr. & Adams, P.D. Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10918-22 (1994).
242. Wu, X. & Levine, A.J. p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3602-6 (1994).
243. Zhang, Y., Xiong, Y. & Yarbrough, W.G. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* **92**, 725-34 (1998).
244. Pomerantz, J. et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**, 713-23 (1998).
245. Zindy, F. et al. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* **12**, 2424-33 (1998).
246. Eischen, C.M., Weber, J.D., Roussel, M.F., Sherr, C.J. & Cleveland, J.L. Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev* **13**, 2658-69 (1999).
247. Juin, P., Hueber, A.O., Littlewood, T. & Evan, G. c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes Dev* **13**, 1367-81. (1999).
248. Soucie, E.L. et al. Myc potentiates apoptosis by stimulating Bax activity at the mitochondria. *Mol Cell Biol* **21**, 4725-36 (2001).
249. Egle, A., Harris, A.W., Bouillet, P. & Cory, S. Bim is a suppressor of Myc-induced mouse B cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6164-9 (2004).
250. Eischen, C.M., Woo, D., Roussel, M.F. & Cleveland, J.L. Apoptosis triggered by Myc-induced suppression of Bcl-X(L) or Bcl-2 is bypassed during lymphomagenesis. *Mol Cell Biol* **21**, 5063-70 (2001).
251. Patel, J.H. & McMahon, S.B. BCL2 is a downstream effector of MIZ-1 essential for blocking c-MYC-induced apoptosis. *J Biol Chem* **282**, 5-13 (2007).
252. Patel, J.H. & McMahon, S.B. Targeting of Miz-1 is essential for Myc-mediated apoptosis. *J Biol Chem* **281**, 3283-9 (2006).
253. Vafa, O. et al. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* **9**, 1031-44 (2002).
254. Sheen, J.H. & Dickson, R.B. Overexpression of c-Myc alters G(1)/S arrest following ionizing radiation. *Mol Cell Biol* **22**, 1819-33 (2002).
255. Oster, S.K., Ho, C.S., Soucie, E.L. & Penn, L.Z. The myc oncogene: MarvelouslyY Complex. *Adv Cancer Res* **84**, 81-154 (2002).
256. Land, H., Chen, A.C., Morgenstern, J.P., Parada, L.F. & Weinberg, R.A. Behavior of *myc* and *ras* oncogenes in transformation of rat embryo fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1917-1925 (1986).
257. Land, H., Parada, L.F. & Weinberg, R.A. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* **304**, 596-602 (1983).
258. Wei, W., Jobling, W.A., Chen, W., Hahn, W.C. & Sedivy, J.M. Abolition of cyclin-dependent kinase inhibitor p16Ink4a and p21Cip1/Waf1 functions permits Ras-induced anchorage-independent growth in telomerase-immortalized human fibroblasts. *Mol Cell Biol* **23**, 2859-70 (2003).

259. Hahn, W.C. et al. Creation of human tumour cells with defined genetic elements [see comments]. *Nature* **400**, 464-8 (1999).
260. Hahn, W.C. et al. Enumeration of the simian virus 40 early region elements necessary for human cell transformation. *Mol Cell Biol* **22**, 2111-23 (2002).
261. Bouchard, C., Marquardt, J., Bras, A., Medema, R.H. & Eilers, M. Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *Embo J* **23**, 2830-40 (2004).
262. Watnick, R.S., Cheng, Y.N., Rangarajan, A., Ince, T.A. & Weinberg, R.A. Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell* **3**, 219-31 (2003).
263. Chiariello, M., Marinissen, M.J. & Gutkind, J.S. Regulation of c-myc expression by PDGF through Rho GTPases. *Nat Cell Biol* **3**, 580-6 (2001).
264. Dominguez-Sola, D. et al. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature* **448**, 445-51 (2007).
265. Evan, G.I., Lewis, G.K., Ramsay, G. & Bishop, J.M. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* **5**, 3610-6 (1985).
266. Shapiro, D.J., Sharp, P.A., Wahli, W.W. & Keller, M.J. A high-efficiency HeLa cell nuclear transcription extract. *DNA* **7**, 47-55 (1988).
267. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5 (1970).
268. Rigaut, G. et al. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**, 1030-2 (1999).
269. Rabilloud, T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics* **2**, 3-10 (2002).
270. Frohlich, T. & Arnold, G.J. Proteome research based on modern liquid chromatography--tandem mass spectrometry: separation, identification and quantification. *J Neural Transm* **113**, 973-94 (2006).
271. Meissner, W., Thomae, R. & Seifart, K.H. The activity of transcription factor IIC1 is impaired during differentiation of F9 cells. *J Biol Chem* **277**, 7148-56 (2002).
272. Gingras, A.C., Gstaiger, M., Raught, B. & Aebersold, R. Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 645-54 (2007).
273. Gully, D., Moinier, D., Loiseau, L. & Bouveret, E. New partners of acyl carrier protein detected in Escherichia coli by tandem affinity purification. *FEBS Lett* **548**, 90-6 (2003).
274. Aphasizhev, R. et al. Isolation of a U-insertion/deletion editing complex from Leishmania tarentolae mitochondria. *Embo J* **22**, 913-24 (2003).
275. Bouveret, E., Rigaut, G., Shevchenko, A., Wilm, M. & Seraphin, B. A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *Embo J* **19**, 1661-71 (2000).
276. Gavin, A.C. et al. Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* **440**, 631-6 (2006).
277. Gottschalk, A. et al. Identification and characterization of novel nicotinic receptor-associated proteins in Caenorhabditis elegans. *Embo J* **24**, 2566-78 (2005).
278. Forler, D. et al. An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. *Nat Biotechnol* **21**, 89-92 (2003).

-
279. Veraksa, A., Bauer, A. & Artavanis-Tsakonas, S. Analyzing protein complexes in *Drosophila* with tandem affinity purification-mass spectrometry. *Dev Dyn* **232**, 827-34 (2005).
280. Brajenovic, M., Joberty, G., Kuster, B., Bouwmeester, T. & Drewes, G. Comprehensive proteomic analysis of human Par protein complexes reveals an interconnected protein network. *J Biol Chem* **279**, 12804-11 (2004).
281. Westermarck, J. et al. The DEXD/H-box RNA helicase RHIII/Gu is a co-factor for c-Jun-activated transcription. *Embo J* **21**, 451-60 (2002).
282. Basu, S., Totty, N.F., Irwin, M.S., Sudol, M. & Downward, J. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell* **11**, 11-23 (2003).
283. Bouwmeester, T. et al. A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* **6**, 97-105 (2004).
284. Koch, H.B. et al. Large-scale identification of c-MYC-associated proteins using a combined TAP/MudPIT approach. *Cell Cycle* **6**, 205-17 (2007).
285. Ewing, R.M. et al. Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol Syst Biol* **3**, 89 (2007).
286. Link, A.J. et al. Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* **17**, 676-82 (1999).
287. Gingras, A.C., Aebersold, R. & Raught, B. Advances in protein complex analysis using mass spectrometry. *J Physiol* **563**, 11-21 (2005).
288. Angers, S. et al. The KLHL12-Cullin-3 ubiquitin ligase negatively regulates the Wnt-beta-catenin pathway by targeting Dishevelled for degradation. *Nat Cell Biol* **8**, 348-57 (2006).
289. Drakas, R., Prisco, M. & Baserga, R. A modified tandem affinity purification tag technique for the purification of protein complexes in mammalian cells. *Proteomics* **5**, 132-7 (2005).
290. Schimanski, B., Nguyen, T.N. & Gunzl, A. Highly efficient tandem affinity purification of trypanosome protein complexes based on a novel epitope combination. *Eukaryot Cell* **4**, 1942-50 (2005).
291. Yang, P., Sampson, H.M. & Krause, H.M. A modified tandem affinity purification strategy identifies cofactors of the *Drosophila* nuclear receptor dHNF4. *Proteomics* **6**, 927-35 (2006).
292. Bukau, B., Weissman, J. & Horwich, A. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* **125**, 443-51 (2006).
293. Kaur, M., Kaul, D. & Sobti, R.C. Receptor-Ck-dependent regulation of genes involved in the cell cycle. *Mol Cell Biochem* **181**, 137-42 (1998).
294. Ralhan, R. & Kaur, J. Differential expression of Mr 70,000 heat shock protein in normal, premalignant, and malignant human uterine cervix. *Clin Cancer Res* **1**, 1217-22 (1995).
295. Chant, I.D., Rose, P.E. & Morris, A.G. Analysis of heat-shock protein expression in myeloid leukaemia cells by flow cytometry. *Br J Haematol* **90**, 163-8 (1995).
296. Yano, M., Naito, Z., Tanaka, S. & Asano, G. Expression and roles of heat shock proteins in human breast cancer. *Jpn J Cancer Res* **87**, 908-15 (1996).
297. Takayama, S., Reed, J.C. & Homma, S. Heat-shock proteins as regulators of apoptosis. *Oncogene* **22**, 9041-7 (2003).
298. Fuks, F., Burgers, W.A., Godin, N., Kasai, M. & Kouzarides, T. Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *Embo J* **20**, 2536-44 (2001).

299. Phelan, M.L., Sif, S., Narlikar, G.J. & Kingston, R.E. Reconstitution of a core chromatin remodeling complex from SWI/SNF subunits. *Mol Cell* **3**, 247-53 (1999).
300. Amati, B., Frank, S.R., Donjerkovic, D. & Taubert, S. Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription. *Biochim Biophys Acta* **1471**, M135-45 (2001).
301. Oskarsson, T. & Trumpp, A. The Myc trilogy: lord of RNA polymerases. *Nat Cell Biol* **7**, 215-7 (2005).
302. Gomez-Roman, N. et al. Activation by c-Myc of transcription by RNA polymerases I, II and III. *Biochem Soc Symp*, 141-54 (2006).
303. Felton-Edkins, Z.A. et al. Direct regulation of RNA polymerase III transcription by RB, p53 and c-Myc. *Cell Cycle* **2**, 181-4 (2003).
304. Maquat, L.E. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 89-99 (2004).
305. Newman, A.J. & Norman, C. U5 snRNA interacts with exon sequences at 5' and 3' splice sites. *Cell* **68**, 743-54 (1992).
306. Skotheim, R.I. & Nees, M. Alternative splicing in cancer: noise, functional, or systematic? *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 1432-49 (2007).
307. Venables, J.P. Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer. *Bioessays* **28**, 378-86 (2006).
308. Srebrow, A. & Kornblihtt, A.R. The connection between splicing and cancer. *J Cell Sci* **119**, 2635-41 (2006).
309. Ruggero, D. & Pandolfi, P.P. Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* **3**, 179-92 (2003).
310. Derenzini, M. et al. Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *J Pathol* **191**, 181-6 (2000).
311. Baker, K.E. & Parker, R. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 293-9 (2004).
312. Houseley, J., LaCava, J. & Tollervey, D. RNA-quality control by the exosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 529-39 (2006).
313. Raijmakers, R., Schilders, G. & Pruijn, G.J. The exosome, a molecular machine for controlled RNA degradation in both nucleus and cytoplasm. *Eur J Cell Biol* **83**, 175-83 (2004).
314. Lehner, B. & Sanderson, C.M. A protein interaction framework for human mRNA degradation. *Genome Res* **14**, 1315-23 (2004).
315. Bartek, J., Lukas, C. & Lukas, J. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 792-804 (2004).
316. Felsher, D.W. & Bishop, J.M. Transient excess of MYC activity can elicit genomic instability and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3940-4 (1999).
317. Brummelkamp, T.R. et al. TBX-3, the gene mutated in Ulnar-Mammary Syndrome, is a negative regulator of p19ARF and inhibits senescence. *J Biol Chem* **277**, 6567-72 (2002).
318. Cheyette, B.N. et al. Dapper, a Dishevelled-associated antagonist of beta-catenin and JNK signaling, is required for notochord formation. *Dev Cell* **2**, 449-61 (2002).
319. Koshiji, M. et al. HIF-1alpha induces genetic instability by transcriptionally downregulating MutSalpa expression. *Mol Cell* **17**, 793-803 (2005).
320. Warren, J.J. et al. Structure of the human MutSalpa DNA lesion recognition complex. *Mol Cell* **26**, 579-92 (2007).

-
321. Acharya, S. et al. hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13629-34 (1996).
 322. Gradia, S., Acharya, S. & Fishel, R. The role of mismatched nucleotides in activating the hMSH2-hMSH6 molecular switch. *J Biol Chem* **275**, 3922-30 (2000).
 323. Menssen, A. & Hermeking, H. Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6274-9 (2002).
 324. Karlsson, A. et al. Defective double-strand DNA break repair and chromosomal translocations by MYC overexpression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9974-9 (2003).
 325. Karlsson, A. et al. Genomically complex lymphomas undergo sustained tumor regression upon MYC inactivation unless they acquire novel chromosomal translocations. *Blood* **101**, 2797-803 (2003).
 326. Rockwood, L.D., Felix, K. & Janz, S. Elevated presence of retrotransposons at sites of DNA double strand break repair in mouse models of metabolic oxidative stress and MYC-induced lymphoma. *Mutat Res* **548**, 117-25 (2004).
 327. Sargent, L.M., Sanderson, N.D. & Thorgeirsson, S.S. Ploidy and karyotypic alterations associated with early events in the development of hepatocarcinogenesis in transgenic mice harboring c-myc and transforming growth factor alpha transgenes. *Cancer Res* **56**, 2137-42 (1996).
 328. Nijman, S.M. et al. A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. *Cell* **123**, 773-86 (2005).
 329. Popov, N., Herold, S., Llamazares, M., Schulein, C. & Eilers, M. Fbw7 and Usp28 Regulate Myc Protein Stability in Response to DNA Damage. *Cell Cycle* **6** (2007).
 330. Popov, N. et al. The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability. *Nat Cell Biol* **9**, 765-74 (2007).
 331. Jolly, C. & Morimoto, R.I. Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1564-72 (2000).
 332. Won, K.A., Schumacher, R.J., Farr, G.W., Horwich, A.L. & Reed, S.I. Maturation of human cyclin E requires the function of eukaryotic chaperonin CCT. *Mol Cell Biol* **18**, 7584-9 (1998).

7 Abkürzungen

Amy-1	Associate of c-Myc
Apc	Adenomatous polyposis coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arf	Alternative reading frame
AS	Aminosäure
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
Baf	Brg1 associated factor
Bax	BCL2 associated X protein
Bcl	B-Cell leukaemia
Bcr	Breakpoint cluster region
Bin1	Bridging interactor protein 1
B-Myc	Brain expressed v-myc myelocytomatosis viral oncogene homologue
BRCA1	Breast cancer susceptibility gene 1
BSA	Bovines Serumalbumin
BTB	Bric-a-brac
c/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
Ca.	circa
Cad	Carbamoyl-phosphatsynthetase 2
Cak	Cyclin activating kinase
CBP	Calmodulin binding protein
CCT	Chaperonin containing TCP subunit
Cdc	Cell division cycle
Cdk	Cyclin dependent kinase
Chd	Chromodomain helicase DNA Binding Protein
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
CMV	Cytomegamovirus
c-Myc	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homologue
Cul1	Cullin 1
Cys	Cystein
d.h	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKc	DNA activated protein kinase catalytic subunit
Dnmt	DNA Methyltransferase
dNTP	Desoxynekleotiftriphosphat
DTT	Dithiotreithol
E-BOX	Enhancer Box
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIF	Eukaryotischer Translations-Elongationsfaktor
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
FbxW7	F-box and WD-40 Domain protein 7
FoxO	Forkhead box O
Gcn5	p300/CBP-associated factor 5
Gsk3	Glycogen synthase kinase 3
GTF	Allgemeiner Transkriptionsfaktor (general transcription factor)
HAT	Histonacetylase
Hcf-1	Human host cell factor-1
HDAC	Histondeacetylase
Hect	Homologous to E6-AP carboxy-terminus

Abkürzungen

HEK	Human embryonal kidney cell line
His	Histidin
HLH	Helix-Loop-Helix
Id2	Inhibitor of DNA binding 2
Ig	Immunglobulin
Ini 1	Integrase Interactor
INR	initiator element
Kb	Kilobasenpaar
Kda	Kilo-Dalton
Ku70	KU antigen 70 kDa subunit
Ku80	KU antigen 70 kDa subunit
LC	Liquid chromatography
L-Myc	Lung carcinoma derived v-myc myelocytomatosis viral oncogene homologue
LZ	leucine zipper
M	Molar
Mad	Max Dimerisation protein
Max	Myc-associated Factor
MB	Myc Box
MEF	Maus-Embryofibroblasten
min.	Minute
Miz-1	Myc-interacting zinc finger protein 1
MM-1	Myc Modulator-1
Mnt	Max binding protein
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
Msh2,6	MutS Homologue 2,6
MudPIT	Multidimensional protein identification strategy
N-CoR	Nuclear receptor corepressor
NF-Y	Nuclear transcription factor Y
N-Myc	Neuroblastoma derived v-myc myelocytomatosis viral oncogene homologue
NP40	Nonidet-P40
NuRD	Nucleosome remodelling and histone deacetylation
OD	Optische Dichte
Pam	Protein associated with Myc
PARP	Poly(ADP)-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
Pol	Polymerasekettenreaktion
POZ	Pox and zinc finger
PP2A	Protein phosphatase 2A
p-TEFb	Positive transcription elongation factor b
Raf	v-Raf-1 murine leukemia viral oncogene homologue 1
Ras	Rat sarcoma viral oncogene homologue
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	rounds per minute, Umdrehungen per Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SAGA	SPT-ADA-GCN5 Acetyltransferase
Scf	SKP-Cullin-F-Box
SDS-PAGE	Natrium-Dodekylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Abkürzungen

SEC	Size Exclusion Chromatography
Sek.	Sekunde
Ser	Serin
Sin3	Switch independent protein 3
Smarc	Swi/Snf related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin
Smrt	Silencing mediator of retinoid and thyroid receptor
SP	Specificity protein
Swi/Snf	Switch/sucrose non fermenting
TAP	Tandem affinity purification
TCA	Trichloressigsäure
Tcp1	T-complex 1
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid
TERT	Telomerase reverse transkriptase
TEV	Tobacco etch virus
TF	Transkriptionsfaktor
TGF	transforming growth factor
Thr	Threonin
Tip	TAT-interactive Protein
tRNA	transfer RNA
TRRAP	Trabsformation/transcription domain associated protein
U	unit, Einheit
USF	Upstream binding factor
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	Volumen per Volumen
VEGF	Vascular endothelial growth factor
w/v	Gewicht per Volumen
YY-1	Yin-Yang 1
z. B.	zum Beispiel
ZNF	Zinkfingerprotein

8 Danksagung

Ich möchte mich bei all denen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Martin Eilers, der mir die Bearbeitung eines sehr interessanten Themas ermöglichte, für seine Betreuung und Geduld. Wie viel ich während der Zeit in seinem Labor gelernt habe, ist mir erst später klar geworden – ich profitiere heute sehr davon!

PD Dr. Wolfgang Meissner danke ich für die intensive Unterstützung und Hilfe sowie die zahlreichen Anregungen und die fortwährende Diskussionsbereitschaft. Er hat maßgeblich zur der Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Für das angenehme Arbeitsklima, für die gute Zusammenarbeit und für die vielen Tipps und Hilfestellungen bei unzähligen Problemen möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Eilers bedanken: Carina Hakelberg-Beimborn, Sandra Bernard, Vincent Beuger, Caroline Bouchard, Daniela Kleine-Kohlbrecher, Inge Pelz, Astrid Kiermaier, Sovana Adhikary, Axel Badouin, Ursula-Christa Eilers, Antje Grzeschiczek, Steffi Herold, Andreas Hock, Bianca Jebavy, Till Kortüm, Werner Lutz, Judith Marquardt, Mona Meyer, Katrin Nowak, Tobias Otto, Viola Paulus, Michael Wanzel, Bernd Berwanger, Eckhardt Bergmann, Sven Gallinat, Carsten Frohme, Stephan Göttig und allen anderen, die mir im Laufe der Zeit im IMT über den Weg gelaufen sind.

Vielen Dank auch meinen Lektoren Thomas Brefort, Sonja Franke, Monika Balzer-Geldsetzer, Sebastian Klein, Maren Bodden und Antonio Rodrigues – man sieht es hoffentlich nicht, aber sie haben viel geleistet.

Einen großen Dank auch an meinen Vater, der nie die Geduld verlor, an meine Frau Katrin, die auch nie die Geduld verlor, aber allen Grund dazu hatte, an alle Freunde, die während der ganzen Zeit immer mal fragten, wie weit die Arbeit denn sei.

9 Curriculum vitae

Jens-Peter Reese,

geboren am 29.08.1974 in Marburg

Schule

- 1981-1985 Grundschule MPS Allendorf / Eder
1985-1994 Edertalschule Frankenberg, 1994 Abitur

Studium

- 1995-1998 Biologie, Universität Regensburg
1998-2000 Biologie, Universität Marburg
2000 Diplomarbeit
 Universität Marburg, Abteilung Genetik, Prof. Dr. A. Klein:
 „Differentielle Proteinexpression bei hypotrichen Ciliaten während der
 Kernentwicklung: Proteomuntersuchungen *Euplotes crassus* und
 Stylonychia lemnae“
2004-2006 Public Health, Universität Bielefeld
2006 Master thesis,
 Universität Bielefeld, Fakultät für Gesundheitswissenschaften,
 Abteilung Epidemiologie und International Public Health, Prof. Dr. O.
 Razum:
 „Factors associated with the willingness to participate and actual enrolment
 in clinical trials of patients with Parkinson's disease“

Wissenschaftliche Arbeit

- 2001-2004 Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Proteomik
2004-2006 Universität Bielefeld, AG Epidemiologie International Public Health
2006-2007 Kompetenznetz Parkinson, Versorgungsforschung
Seit Dez. 2006 Klinik für Neurologie, Universität Marburg, Gesundheitsökonomie und
 Versorgungsforschung

Promotion

- Seit Feb. 2001 Universität Marburg
 Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung; Prof. M Eilers:
 „Identifizierung von *bona fide* Interaktionspartnern der
 Transkriptionsfaktoren c-Myc und Miz-1“

Erklärung

ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Identifizierung von *bona fide* Interaktionspartnern der Transkriptionsfaktoren c-Myc und Miz-1 “

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe, angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Ort / Datum

Jens- Peter Reese