

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller



# Charakterisierung der E3 Ligase HectH9 und deren Einfluss auf cMyc und TopBP1

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

Andreas K. Hock aus Alzenau

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg am: 10.09.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund  
Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. Stefan Bauer  
Referent: Prof. Dr. Martin Eilers  
Koreferent: Prof. Dr. Thorsten Stiewe

*Für Paula + Viola*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1. Krebserkrankungen . . . . .	4
1.2. Der Transkriptionsfaktor cMyc . . . . .	6
1.2.1. Allgemeine Eigenschaften von cMyc . . . . .	6
1.2.2. cMyc und Zellzyklus . . . . .	9
1.2.3. Gen Aktivierung durch cMyc . . . . .	9
1.2.4. Gen Repression durch cMyc . . . . .	10
1.3. Der Transkriptionsfaktor Miz1 . . . . .	12
1.3.1. Allgemeine Eigenschaften von Miz1 . . . . .	12
1.4. Proteinabbau . . . . .	14
1.4.1. Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems . . . . .	14
1.4.2. RING- und HECT E3 Ubiquitin Ligasen . . . . .	17
1.4.3. Verschiedene Arten der Ubiquitinierung . . . . .	18
1.4.4. Die E3-Ubiquitin-Ligase HectH9 . . . . .	19
1.5. Das DNA Schadens Reparatursystem . . . . .	21
1.5.1. Der DNA Schadenssignalmediator TopBP1 . . . . .	22
1.6. Zielsetzung der Arbeit . . . . .	24
<b>2. Material</b>	<b>25</b>
2.1. Geräte . . . . .	25
2.2. Einmal- und Plastikware . . . . .	26
2.3. Kits . . . . .	27
2.4. Bakterien . . . . .	28
2.5. Zelllinien . . . . .	28
2.6. Sh RNAs . . . . .	28
2.7. Vektoren . . . . .	28
2.7.1. Expressionsplasmide zur transienten Transfektion . . . . .	29
2.7.2. Expressionsplasmide zur Erzeugung rekombinanter Retro- viren . . . . .	31
2.8. Antikörper . . . . .	32
2.9. qRT-PCR Primer . . . . .	33

2.10. Mutagenese Primer . . . . .	33
2.11. Klonierprimer . . . . .	34
2.12. Chemikalien . . . . .	34
2.13. Materialien für die Zellkultur . . . . .	36
2.14. Medien für Bakterien . . . . .	36
2.15. Puffer . . . . .	37
2.16. Molekulargewichtsstandards . . . . .	40
<b>3. Methoden</b>	<b>41</b>
3.1. Nukleinsäure Techniken . . . . .	41
3.2. Zellkultur . . . . .	44
3.3. Proteinbiochemische Methoden . . . . .	46
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>49</b>
4.1. HectH9 bindet Miz1 und cMyc <i>in vivo</i> . . . . .	49
4.2. HectH9 ubiquitiniert cMyc <i>in vivo</i> . . . . .	50
4.3. Die HectH9 Ziellysine des cMyc Proteins sind konserviert . . . . .	51
4.4. Genauere Identifizierung der Ziellysine von HectH9 im cMyc Onkoprotein . . . . .	52
4.5. Die HectH9 abhängige Ubiquitinierung von cMyc beschleunigt dessen Abbau nicht . . . . .	55
4.6. Myc KR6 induziert weder Apoptose noch Zellzyklus Progression . . . . .	57
4.7. Myc KR6 induziert bekannte cMyc Zielgene nicht mehr . . . . .	58
4.8. P300 bindet Myc KR6 schwächer als wildtyp Myc . . . . .	60
4.9. Myc KR6 rekrutiert kein p300 auf den Nukleolin Promotor . . . . .	61
4.10. HectH9 ist für cMyc abhängige Transaktivierung notwendig . . . . .	63
4.11. Miz1 überexprimierende Zellen zeigen Anzeichen von DNA Schaden . . . . .	66
4.12. HectH9 ubiquitiniert TopBP1 <i>in vivo</i> . . . . .	67
4.13. HectH9 degradiert TopBP1 nach UV-Bestrahlung . . . . .	68
4.14. TopBP1 S1159A wird stärker ubiquitiniert . . . . .	70
4.15. TopBP1 S1159A wird ohne UV induzierten DNA Schaden abgebaut . . . . .	71
4.16. cMyc verdrängt TopBP1 von Miz1 . . . . .	72
4.17. Lokalisation von HectH9 . . . . .	73
4.18. Klonierung verschiedener HectH9 GFP Fusionsproteine . . . . .	75
4.19. Relokalisation von HectH9 durch DNA-Schaden . . . . .	76
4.20. Lokalisation von HectH9 Punktmutanten . . . . .	78
<b>5. Diskussion</b>	<b>80</b>

5.1. Kooperation von HectH9 und cMyc . . . . .	80
5.1.1. cMyc wird von HectH9 ubiquitiniert, aber nicht degradiert	80
5.1.2. Die von HectH9 ubiquitinierten Lysine des cMyc Proteins sind konserviert . . . . .	84
5.1.3. Myc KR6 infizierte Zellen arretieren in der G1 Phase des Zellzyklus . . . . .	85
5.1.4. Das cMyc Miz1 HectH9 Netzwerk . . . . .	87
5.2. HectH9 und TopBP1 . . . . .	89
5.2.1. TopBP1 wird von HectH9 ubiquitiniert . . . . .	89
5.2.2. HectH9 degradiert TopBP1 nach UV-B induzierten DNA Schaden . . . . .	89
5.2.3. Myc moduliert die Aktivität von HectH9 auf TopBP1 . . .	90
5.2.4. HectH9 Lokalisation wird durch DNA Schaden reguliert . .	91
5.2.5. Ausblick . . . . .	93
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>7. Summary</b>	<b>97</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>I</b>
A.1. Array Daten . . . . .	I
A.2. Abkürzungsverzeichnis . . . . .	VIII
A.2.1. Präfixe . . . . .	VIII
A.2.2. Einheiten . . . . .	VIII
A.2.3. Proteine, Proteindomänen und andere Biomoleküle . . . .	VIII
A.2.4. Lösungen und Chemikalien . . . . .	IX
A.2.5. Andere Abkürzungen . . . . .	X
<b>B. Danksagung</b>	<b>XII</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Krebserkrankungen

Krebs ist eine klonale Krankheit, die durch Anhäufung mehrerer genetischer Mutationen entsteht (Vogelstein u. Kinzler, 1993). Diese Mutationen werden von der jeweiligen Zelle akkumuliert, da sie durch erhöhtes proliferatives Potential oder Resistenz gegen wachstumshemmende Signale einen Vorteil gegenüber anderen Zellen bedeuten. Diese Zellen können sich so unkontrolliert teilen und schließlich einen Tumor bilden (Bodmer, 1994). Zu verstehen, welche Mutationen bei welchen Genen ursächlich für die Krebsentwicklung sind, ist von essentieller Bedeutung für die moderne Krebsforschung.

Die an der Tumorentstehung beteiligten Gene werden anhand ihrer Eigenschaften in zwei Familien eingeteilt: Onkogene und Tumorsuppressorgene (Harvey Lodish, 2000). Onkogene entstehen aus so genannten Proto-Onkogenen durch Veränderungen wie zum Beispiel Punktmutationen oder Rekombinationen und erhalten so qualitativ oder quantitativ veränderte biologische Eigenschaften. Zum Beispiel finden sich in 90 % aller Fälle von chronischer myeloischer Leukämie eine Translokation zwischen Chromosom 9 und 22. Hierdurch entsteht die Fusion der Gene *cABL* und *BCR*. Das *ABL*-Gen kodiert für eine Tyrosinkinase, welche eine wichtige Rolle in der Zellproliferation spielt. Durch einen Bruch der DNA und eine reziproke Translokation wird das Gen für die *ABL* Tyrosinkinase mit dem der *BCR*-Region fusioniert. Dabei wird die Kinase konstitutiv aktiv, da sie durch die Translokation nicht mehr durch die auf Chromosom 9 verbliebene inhibitorische Kappenstruktur reguliert wird. Dies führt zu unkontrollierter Zellteilung. Zur Bildung größerer oder geringerer Mengen von Proteinen kommt es durch quantitative Veränderungen eines Onkogens, wie Amplifikation, konstitutive Aktivierung des Genlokus oder Störungen im Proteinabbau. So ist der Zellwachstum induzierende Transkriptionsfaktor cMyc in Lymphomen häufig an oder in unmittelbarer Nähe der Aminosäure Threonin 58 mutiert. Diese Mutationen zerstören das Myc Phosphodegron und erhöhen so die Myc Halbwertszeit. Dies führt zu unphysiologisch hohen cMyc Protein Mengen in der Zelle (Bahram u. a., 2000; Gregory u. Hann, 2000; Niklinski u. a., 2000). Onkogene werden als dominant bezeichnet, da bereits die Veränderung eines Allels in einem tumorigenes Protein eine Fehl-

regulation zur Folge hat (Harvey Lodish, 2000).

Als Tumorsuppressorgene werden negative Regulatoren des Zellzyklus und der Zellteilung beziehungsweise positive Regulatoren des Zelltodes bezeichnet. Sie wurden ursprünglich als rezessiv beschrieben: Es wurde angenommen, dass der Verlust beider Allele notwendig ist, um die tumorsuppressive Eigenschaft eines Gens zu verlieren (Knudson, 1971; Comings, 1973). Untersuchungen von Mäusen, die durch genetische Manipulation heterozygot für ein Gen sind, machten jedoch deutlich, dass sich Tumorsuppressoren wie zum Beispiel p53 und p27Kip1 auch haploinsuffizient verhalten können (Fero u. a., 1998; Venkatachalam u. a., 1998). Demnach kann ein Allel nicht die volle Funktionalität zweier Wildtypallele kompensieren. Dies hat eine deutlich erhöhte Tumorprädisposition zur Folge. (zusammengefasst in Payne u. Kemp (2005)).

Die Tumorentwicklung ist kein abrupter Prozess; während der Karzinogenese werden Tumorsuppressoren schrittweise inaktiviert und Onkogene überexprimiert, um zelluläre Sicherheitsmechanismen wie Seneszenz und Apoptose zu umgehen und so abnormales Wachstum zu ermöglichen. Die Kombination von inaktivierten Suppressoren und aktivierten Onkogenen kann sich von Tumor zu Tumor unterscheiden und ist kein von Beginn festgelegter Prozess. Es gibt jedoch spezifische Schlüsselproteine (wie zum Beispiel p53, cMyc und APC) und Signalkaskaden (wie zum Beispiel Rezeptortyrosinkinasen-, DNA Schaden- oder Wnt Signalweg), die häufig von Mutationen betroffen sind. Während ihrer Entwicklung werden Tumoren von diesen Mutationen abhängig, da Tumorzellen zum Beispiel ein konstitutiv aktives Rezeptortyrosinkinase-Signal benötigen um unabhängig von ihrem Umfeld proliferieren zu können. Dies wird durch Experimente verdeutlicht, die zeigen, dass schon die kurze Inaktivierung von Onkogenen eine dauerhafte Tumorregression ermöglicht (Weinstein u. Joe, 2008). Diese Abhängigkeit wird als „oncogene addiction“ bezeichnet. Die Identifikation solcher krebsspezifischer Gene ist deshalb nicht nur zum Verständnis, sondern auch zur Entwicklung von Tumorthérapien unerlässlich. Des Weiteren bieten sie zusätzlich die Möglichkeit der frühzeitigen Identifizierung von Individuen mit erhöhtem Krankheitsrisiko. Außerdem können so prognostische Marker für verschiedene Krebstherapien erarbeitet werden um eine Vorhersage treffen zu können, ob bestimmte Patienten von einem Medikament überhaupt profitieren können. So werden Leukemiepatienten nur dann mit Imatinib, einem *BCR-ABL* Inhibitor behandelt, wenn das *BCR-ABL* Onkogen nachweisbar ist. Dieses Beispiel macht deutlich, dass die Behandlung von Patienten direkt von der Tumorforschung profitiert.

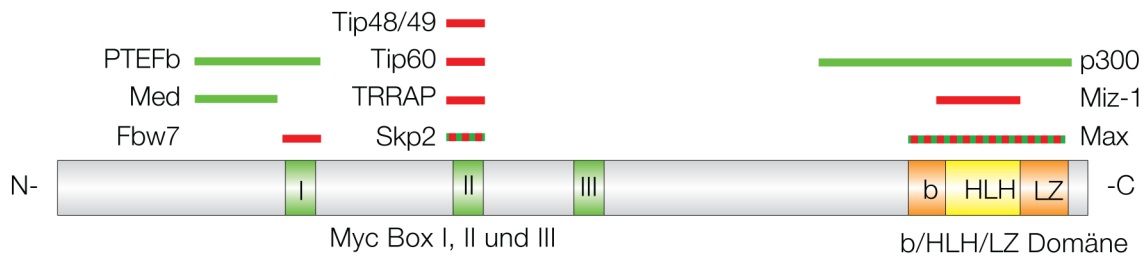


## 1.2. Der Transkriptionsfaktor cMyc

Myc wurde ursprünglich als das virales Onkogen *v-myc* des MC29 Stammes des „avian leukemia virus“ (ALV) beschrieben (Sheiness u. a., 1978). Dieses Retrovirus induziert in Vögeln Tumore und die Myelocytomatose, die namensgebend für das Gen ist. Kurze Zeit nach der Entdeckung des viralen Mycs wurde klar, dass weitere Myc Homologe in Ratte, Mensch und Maus existieren (Dalla-Favera u. a., 1982). Heute ist es eindeutig, dass Myc ein evolutionär hochkonserviertes Gen ist, welches schon in Organismen wie *D. melanogaster* und *C. elegans* zu finden ist.

### 1.2.1. Allgemeine Eigenschaften von cMyc

Das *c-myc* Gen kodiert ein im Zellkern lokalisiertes Protein, cMyc das als Transkriptionsfaktor fungiert. In quieszenten Zellen ist die Expression von cMyc sehr niedrig. *C-myc* gehört zu den so genannten „early response“ Genen, welche nach Stimulation mit Serum oder Wachstumsfaktoren rasch induziert werden. Die Erhöhung der Myc Proteinmenge hat den Eintritt der Zellen in den Zellzyklus zur Folge. Nach initialem Anstieg der Myc Konzentration reduziert sich diese auf basale Mengen. Das Gegenteil ist nach Serumentzug zu beobachten. Die Depletion von Wachstumsfaktoren hat eine starke Reduktion der *c-myc* mRNA und Proteinmengen zur Folge und die Zellen arretieren in der G1 Phase. Für die frühe embryonale Entwicklung bis Tag 9,5 und die Proliferation von ES-Zelllinien scheint cMyc Aktivität jedoch nicht essenziell zu sein, da der „Myc-knockout“ erst am 10,5 Tag der Embryonalentwicklung stirbt (Davis u. a., 1993). Das onkogene Potential von *c-myc* kommt zum Tragen, wenn das Gen zum falschen Zeitpunkt durch exogene Faktoren oder durch genetische Veränderungen transkribiert wird. Die dauerhafte Aktivität des *c-myc* Gens verhindert den Austritt einer Zelle aus dem Zellzyklus. Erhöht man im Tiermodell das *c-myc* Gen konstitutiv, führt dies zur Entstehung von Tumoren. So entwickeln 90% aller Mäuse, in denen cMyc durch den IgH „enhancer“ künstlich aktiviert wird, innerhalb von fünf Monaten Lymphome (Harris u. a., 1988).



**Abb. 1.1.: Schematische Darstellung des cMyc Proteins**

Dargestellt sind die einzelnen Domänen des cMyc Proteins: I, II, III (grün) markieren die konservierten, für Proteine der Myc Familie typischen Myc Boxen; des Weiteren sind die Positionen der basischen Region (b, orange), der „Helix-Loop-Helix“ Domäne (HLH, gelb) und des „Leuzin Zipper“ Motivs (LZ, orange) dargestellt.

Die Balken markieren die für die angegebenen Proteine zur Bindung wichtigen Abschnitte. Rot: Repressive Interaktionen; Grün: Aktivierende Interaktionen.

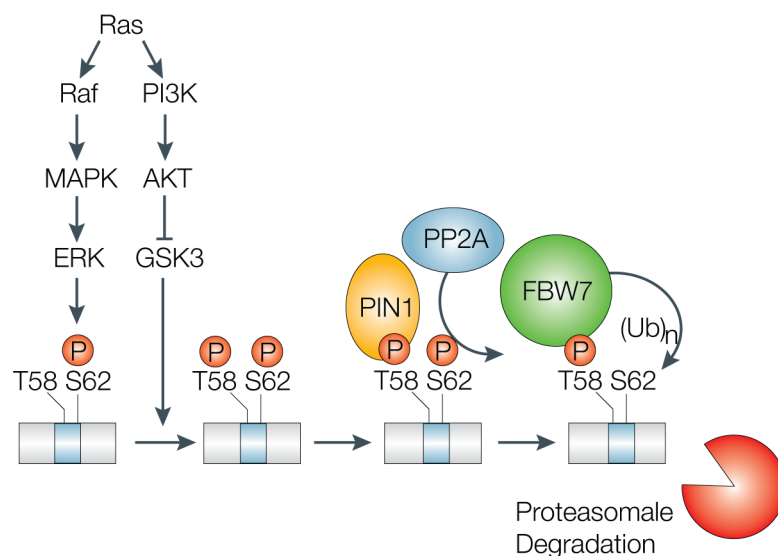
(verändert nach Adhikary u. Eilers (2005))

Das cMyc-Protein ist durch zwei hoch konservierte Regionen charakterisiert (Abbildung 1.1). Die aminoterminalen Transaktivierungsdomäne ist essenziell für die Myc Funktion. Sie beinhaltet die hoch konservierten cMyc-Boxen (MBI, MBII und MBIII), die typisch für die Myc Genfamilie sind. Besonders hervorzuheben ist die MBII-Sequenz. Sie dient als Bindemotiv für viele Kofaktoren von cMyc. In der carboxyterminalen Region befindet sich das ebenfalls hoch konservierte „b/HLH/LZ“ Motiv. Die basische Region (b) dient der spezifischen Bindung an so genannte E-Boxen in der DNA. Im Gegensatz dazu ist das „HLH/LZ“ Motiv („Helix-Loop-Helix Leuzin Zipper“) für Protein-Protein-Interaktionen, im besonderen für eine Heterodimerisierung mit Max verantwortlich. Das zentral liegende nukleäre Lokalisations-Signal (NLS), ist für die korrekte Lokalisation von cMyc im Nukleus verantwortlich (Henriksson u. Lüscher, 1996).

Die cMyc Stabilität wird durch Phosphorylierung von Serin 62 (S62) und Threonin 58 (T58) in der Myc Box I reguliert (Welcker u. a. (2004); Abbildung 1.2). Ras induziert die Phosphorylierung von S62 durch den MAPK („*Mitogen activated Pathway Kinase*“) Signalweg und die Inhibition von GSK3 („*Glykogen Synthase Kinase 3*“) durch PI3K („*Phosphatidylinositol 3-Kinase*“). GSK3 kann T58 erst phosphorylieren, nachdem S62 durch MAPK phosphoryliert wurde. cMyc mit phosphoryliertem T58 und S62 wird von der Isomerase Pin1 („*Prolyl isomerase 1*“) erkannt, welche Prolin 59 isomerisiert und dadurch die Dephosphorylierung von S62 durch PP2A („*Phosphatase-2A*“) ermöglicht. Dies resultiert in cMyc phospho-T58 welches durch die Ubiquitin E3 Ligase SCF<sup>F<sub>W</sub>B7</sup> mit Polyubiqui-

tinketten für die proteasomale Degradation markiert wird.

Das zur Familie der deubiquitinierenden Enzyme gehörende Usp28 („*ubiquitin specific protease 28*“) kann die von SCF<sup>FWB7</sup> an cMyc gebundenen Ubiquitine wieder abspalten und dessen Stabilität erhöhen (Popov u. a., 2007). cMyc-Proteine mit Mutationen an oder in unmittelbarer Nähe der Aminosäure T58, die die Phosphorylierung an dieser Stelle verhindern, werden nicht mehr abgebaut, sondern bewirken eine Akkumulation des cMyc Proteins (Bahram u. a., 2000; Gregory u. Hann, 2000; Niklinski u. a., 2000). Diese cMyc stabilisierenden Mutationen werden bei Patienten mit Burkitt-Lymphom gefunden (Axelson u. a., 1995). Zellen mit diesen Mutationen zeigen außerdem in Mäusen ein erhöhtes Transformationspotential (Hemann u. a., 2005).



**Abb. 1.2.: Regulation der cMyc Stabilität**

Dargestellt sind die Ereignisse, die die Phosphorylierungen von cMyc und dadurch dessen Abbau kontrollieren. Genaue Erläuterungen der einzelnen Schritte finden sich in Abschnitt 1.2.1.

(verändert nach Adhikary u. Eilers (2005))

### 1.2.2. cMyc und Zellzyklus

Myc fördert die Progression durch den Zellzyklus (Amati u. a., 2001; Dang, 1999) und ist in der Lage, in quieszenten Fibroblasten DNA-Synthese zu induzieren (Eilers u. a., 1991). In Kombination mit anderen Onkoproteinen kann cMyc primäre Nagerzellen transformieren und Tumorwachstum einleiten (Land u. a., 1983). Als Ursache für das unkontrollierte Zellwachstum, welches durch cMyc hervorgerufen wird, gilt vor allem die Deregulation der Zellzykluskontrolle. So ist cMyc in der Lage, der Inhibition des Zyklin D2 Promoters entgegen zu wirken und so das Inhibitorprotein p27 durch Zyklin D2/Cdk4 Komplexe zu sequestrieren (Bouchard u. a., 1999). Der Transkriptionsfaktor Miz1 aktiviert *INK4b* und arretiert so den Zellzyklus. cMyc kann durch Bindung an Miz1 diese Aktivierung verhindern und somit einen Miz1 vermittelten Proliferationsarrest überkommen (Staller u. a. (2001); siehe Kapitel 1.2.4).

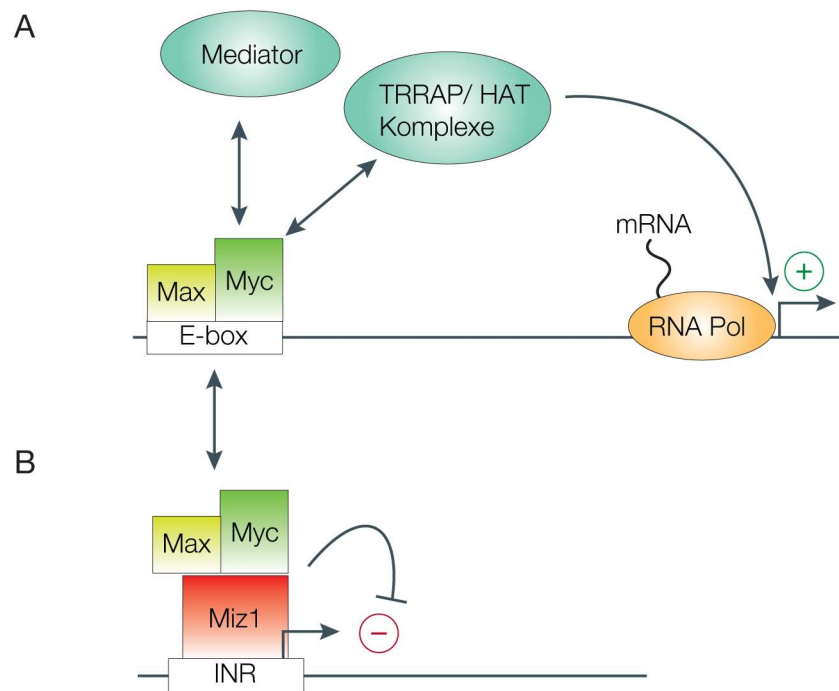
### 1.2.3. Gen Aktivierung durch cMyc

Myc ist der einzige bekannte Transkriptionsfaktor, der sowohl RNA-Polymerase I, -II und -III (PolI, PolII, PolIII) abhängige Promotoren aktivieren kann (Grewal u. a., 2005; Gomez-Roman u. a., 2003). Viele PolII abhängige Zielgene von cMyc sind an Zellwachstum und Translation beteiligt. Bis jetzt wurde aber noch kein Zielgen identifiziert, das die Fähigkeit von cMyc, Zellproliferation zu induzieren, ersetzen kann (Berns u. a., 2000; Nikiforov u. a., 2002). cMyc kann eine Vielzahl von verschiedenen zellulären Prozessen wie zum Beispiel die Regulation der Zell-Matrix Interaktionen und der DNA-Synthese beeinflussen, die meisten Zielgene aktivieren aber Zellwachstum und Translation (Coller u. a., 2000; Fernandez u. a., 2003; Guo u. a., 2000; Schuhmacher u. a., 2001). Um die verschiedenen biologischen Aktivitäten von cMyc wie Transformation, Zellwachstum und Aktivierung von Genen zu verstehen, kann man Myc nicht isoliert betrachten, sondern muss das Interaktionsnetzwerk von cMyc mit einbeziehen. Das Max-Protein bildet über die „b/HLH/LZ“-Domäne Heterodimere mit cMyc und ohne diese Heterodimerisierung hat Myc keine transkriptionelle Aktivität. Um Zielgene zu aktivieren, bindet der Myc Max Heterodimer an die sogenannte kanonische E-Box-Sequenz 5'-CACGTG-3' und ähnliche Sequenzen (Blackwell u. a., 1990). Um Zielgene zu aktivieren ist die alleinige Bindung des Heterodimers nicht genug. Die Myc Max Assoziation an Promotoren dient als Signal für die Rekrutierung weiterer Faktoren, die eine effiziente Transkription ermöglichen (Abbildung 1.3, Amati u. a. (1993)). Die Halbwertszeit von Max ist im Gegensatz zu cMyc, welche circa 30

Minuten beträgt, mit über 3 Stunden sehr lang (Wagner u. a., 1992) und es wird im Gegensatz zu Myc auch nicht auf transkriptioneller Ebene reguliert (Blackwood u. a., 1992). Dimere aus Max und cMyc funktionieren als transkriptionelle Schalter, die Proliferation, Wachstum und Apoptose durch Rekrutierung weiterer Faktoren induzieren. Die Bindung von Max an ein Protein der Mxd-Familie (Mxd 1-4) induziert eine gegenteilige Reaktion wie zum Beispiel Differenzierung und Wachstumsarrest. Deshalb sind Mxd-Proteine hauptsächlich in quieszenten Zellen exprimiert, wo sie der Expression von cMyc Zielgenen entgegen wirken. Diese antagonistische Wechselwirkung wurde von Henriksson u. Lüscher (1996) in Rattenfibroblasten nachgewiesen.

#### 1.2.4. Gen Repression durch cMyc

Bei Überexpression von cMyc werden nicht nur viele Gene aktiviert, sondern auch zahlreiche Gene reprimiert (Claassen u. Hann, 1999; Facchini u. Penn, 1998). Im Gegensatz zur Myc abhängigen Aktivierung ist die Myc abhängige Repression nicht im gleichen Maße verstanden. Am besten beschrieben ist der Repressionsmechanismus über die Bindung des Transkriptionsfaktors Miz1 („*Myc interacting zincfingerprotein 1*“). Miz1 bindet an Initiator-Elemente in Promotoren, wie zum Beispiel das des *INK4b* Gens und kann diese so aktivieren (Staller u. a., 2001). Bildet cMyc mit Max und Miz1 einen trimeren Komplex auf dem Initiator-Element (Abbildung 1.3), so wird die Expression von *INK4b* reprimiert. Teilweise wird diese Repression über die Verdrängung von Aktivatoren vermittelt. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung von cMyc an Miz1 die Interaktion zwischen Miz1 und dessen Kofaktor p300 reduziert (Peukert u. a., 1997), und damit zu einer Reduktion der lokalen Histonacetylierung beiträgt.



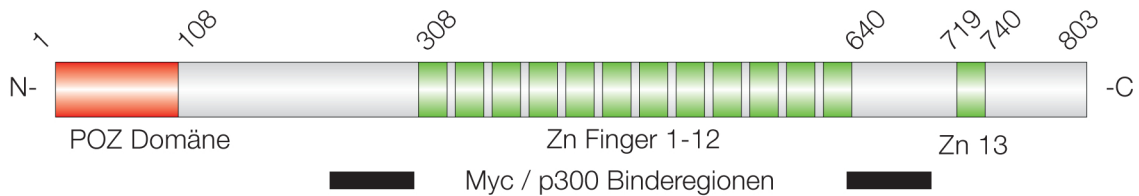
**Abb. 1.3.: Schema der cMyc abhängigen Genregulation**

**A:** cMyc kann als Heterodimer mit Max so genannte E-Boxen binden und durch Rekrutierung von weiteren Kofaktoren wie zum Beispiel den TRRAP Komplex das Chromatin öffnen und so die Bindung der generellen Transkriptionsfaktoren ermöglichen.

**B:** Der cMyc Max Heterodimer kann über Miz1 indirekt an Initiator Elemente (INR) binden und so Miz1 Zielgene reprimieren. Der genaue Mechanismus dieser Repression ist noch nicht endgültig aufgeklärt. (verändert nach Adhikary u. Eilers (2005))

### 1.3. Der Transkriptionsfaktor Miz1

Das Zinkfingerprotein Miz1 wurde zuerst in einem Hefe-Zwei-Hybrid Experiment als neuer Interaktionspartner von cMyc identifiziert und daher als „*Myc interacting zincfingerprotein 1*“, bezeichnet. Nach der vollständigen Sequenzierung des humanen Genoms ist klar, dass es, im Gegensatz zu Myc, keine weiteren humanen Gene der Miz Familie gibt. Das humane Miz1 kodierende Gen liegt auf Chromosom 1 zwischen 1p36.1 und 1p36.2 (Tommerup u. Vissing, 1995) und ist das menschliche Homolog eines ubiquitär exprimierten Mausproteins. Miz1 ist essentiell für die Mausentwicklung. Die genetische Deletion von Miz1 in der Maus führt zur Letalität um Tag 7,5 der Embryonalentwicklung (Adhikary u. a., 2003).



**Abb. 1.4.: Schematische Darstellung des Miz1 Proteins**

Dargestellt sind die einzelnen Domänen des Miz1 Proteins: Die „pox virus and zinc finger“ Domäne (POZ, rot) und die 13 Zink Finger Motive (grün). Die Balken markieren die für die Bindung an p300 wichtigen Abschnitte.

#### 1.3.1. Allgemeine Eigenschaften von Miz1

Die hochkonservierte POZ-Domäne („pox virus and zinc finger“) ist eine in vielen Proteinen vorkommende Proteininteraktionsdomäne (Bardwell u. Treisman, 1994), die aus alternierenden  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern besteht (Ahmad u. a., 1998). Sie hat, bedingt durch die Aminosäurekombination stark hydrophobe Eigenschaften und vermittelt oft die lipophile Bindung an weitere POZ-Domänen (Dhordain u. a., 1995). Trotzdem wurde für Miz1 bisher keine Homodimerisierung nachgewiesen werden. Weiter carboxyterminal folgen zwölf Zink-Finger Domänen vom Cys2-His2-Typ unmittelbar aufeinander. Ein dreizehnter Zinkfinger liegt circa 80 Aminosäuren vor dem Carboxyterminus. Die Sequenz zwischen dem zwölften und dreizehnten Zinkfinger ist in verschiedenen Spezies konserviert und konnte als die Interaktionsdomäne für das cMyc-Protein nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu anderen POZ-Domänen-Proteinen ist Miz1 ein lösliches Prote-

in welches sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma nachweisbar ist (Peukert u. a., 1997). Im Zytoplasma ist Miz1 an Mikrotubuli assoziiert (Peukert u. a., 1997). Ziegelbauer u. a. (2001) konnten zeigen, dass für diese Interaktion die Region zwischen dem siebten und elften Zinkfinger nötig ist.



## 1.4. Proteinabbau

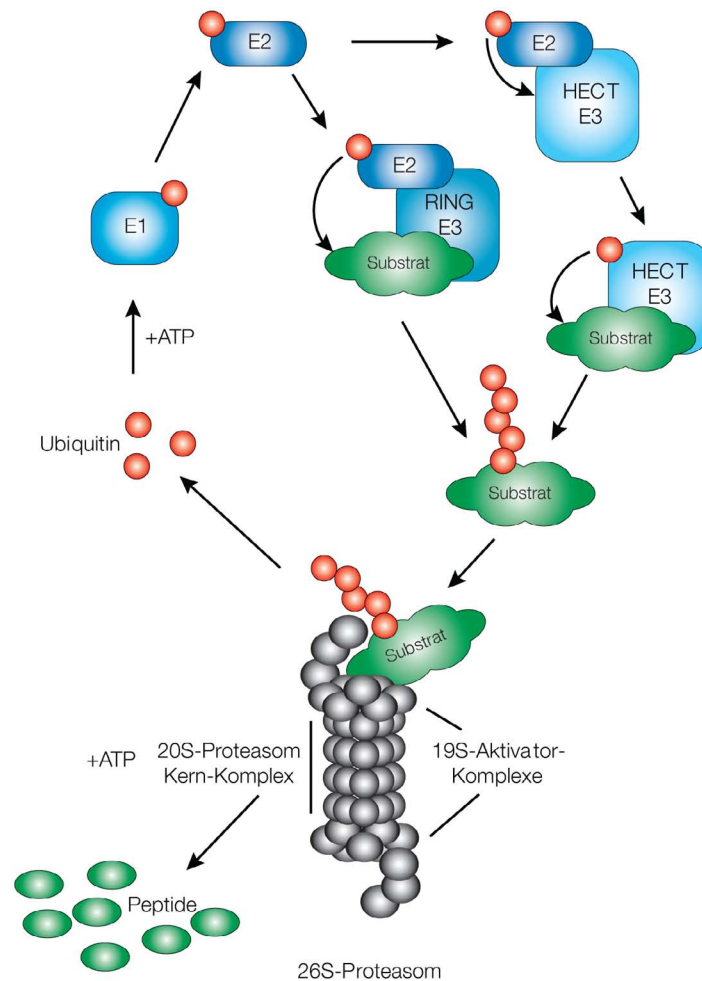
Proteine sind neben den Nukleinsäuren die Grundbausteine des Lebens. Aktivität, Stabilität und subzelluläre Verteilung von Proteinen können durch verschiedene posttranslationale Modifikationen moduliert werden. Eine dieser Modifikationen ist die Ubiquitinierung, für deren Beschreibung 2004 der Chemie-Nobelpreis an Ciechanover, Hershko und Rose (Giles, 2004) vergeben wurde. Ubiquitin besteht aus 76 Aminosäuren und wird durch so genannte Ubiquitin E3 Ligasen direkt oder indirekt an weitere Proteine, Ubiquitin selbst eingeschlossen, kovalent gekoppelt. Diese Bindung erfolgt in der Regel über Lysin Reste des Zielproteins. Einzelne Ubiquitine können so untereinander zu langen Polyubiquitinketten verknüpft werden. Die Ubiquitinierung von Proteinen ist eine Schlüsselreaktion für den Abbau überflüssig gewordener oder fehlerhafter Proteine. Das Ubiquitin-Proteasom-System ist aber viel mehr als das nur ein Proteinentorgungssystem. Es bietet eine effiziente Möglichkeit der Regulation von Aktivität, Lokalisation und Stabilität von Zielproteinen, die für viele Schlüsselprozesse unabdingbar ist (Hershko u. Ciechanover, 1998).

### 1.4.1. Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems

Wie oben beschrieben wird die Modifikation eines Proteins mit Ubiquitin als Ubiquitinierung bezeichnet. Hierfür wird zwischen der Carboxylgruppe des C-terminalen Glycins des Ubiquitins und der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines internen Lysins des Substrates eine Isopeptidbindung ausgebildet. Erfolgt diese Verknüpfung zwischen mehreren Ubiquitinmolekülen, entstehen lange Polyubiquitinketten. Dies wird als Polyubiquitinierung bezeichnet. Die mehrfache Ubiquitinierung eines Substrats an verschiedenen Lysinen wird als Multiubiquitinierung bezeichnet. Ubiquitinierung ist wie Phosphorylierung oder Acetylierung von Proteinen eine reversible Reaktion und kann durch Ubiquitin-Hydrolasen, sogenannte DUBs („*Deubiquitinating enzymes*“) rückgängig gemacht werden (Swaminathan u. a., 1997; Pickart, 2001; Yao u. Cohen, 2002). Zu Beginn der Ubiquitinierungsreaktion wird die C-terminale Carboxylgruppe des Ubiquitins aktiviert. Diese Reaktion katalysiert in der Regel in Eukaryonten UBA1 („*ubiquitin activating enzyme 1*“). Es bildet unter Verbrauch von ATP einen Thioester zwischen dem zuvor aktivierten Carboxyterminus des Ubiquitins und einem Cystein im aktiven Zentrum des UBA1 Enzyms aus (McGrath u. a., 1991). Das so aktivierte Ubiquitin wird nun unter Bildung eines weiteren Thioesters zu einem Cysteinrest eines Ubiquitin konjugierenden Enzyms (UBC) transferiert. UBC-Proteine können zwar Ubiqui-

tin direkt auf Substratproteine übertragen, diese Reaktion ist aber ineffizient und unspezifisch. Zusätzliche Faktoren, die Ubiquitin-Ligasen ermöglichen spezifische und effiziente Ubiquitinierungsreaktionen.

Ubiquitin-Ligasen dienen als spezifischer Adapter zwischen beladenem E2 Enzym und Substrat (Jackson u. a., 2000a). In manchen Fällen, in denen Ubiquitin-Ligasen alleine keine Ubiquitinketten ausbilden können, werden zusätzliche Polyubiquitinierungs-Faktoren benötigt (Koepl u. a., 1999; Imai u. a., 2002). Ubiquitinierung läßt sich dem zu Folge als in Einzelschritte unterteilte enzymatische Gesamtreaktion beschreiben, in der Ubiquitin zuerst aktiviert, auf das E2 Enzym transferiert und schließlich auf ein Substrat übertragen wird. Die Substratspezifität wird hierbei durch die E3 Ligase gewährleistet. Entsprechend der Reihenfolge, in der die Enzyme in dieser Kaskade vorkommen, werden die einzelnen Enzyme als E1- (UBA1), E2- (UBC) und E3-Ubiquitin-Ligasen bezeichnet.



**Abb. 1.5.: Das Ubiquitin-Proteasom-System**

E1-Enzyme binden unter Verbrauch von ATP Ubiquitin und übertragen es auf E2 Ligasen. Anschließend wird das Ubiquitin unter Mitwirkung von E3-Ubiquitin-Ligasen auf einen Lysinrest des Substrats übertragen. Dieser Schritt wiederholt sich, bis eine Polyubiquitinkette aufgebaut ist, welche vom Proteasom erkannt wird. Nach Translozierung des Substratproteins in die 20S Untereinheit des Proteasoms wird das Substrat zu Peptiden abgebaut, welche der Zelle für die Proteinneusynthese zur Verfügung stehen.

### 1.4.2. RING- und HECT E3 Ubiquitin Ligasen

Die E3-Ubiquitin-Ligasen gliedern sich in zwei Gruppen, die sich sowohl im Funktionsmechanismus als auch in Strukturelementen unterscheiden. Die erste und zahlenmäßig größere Gruppe (Übersicht in Pickart (2001)) ist charakterisiert durch die so genannte RING Domäne, eine dem Zink-Finger verwandte Domäne die in zwei verschiedenen Konfigurationen auftritt (sechs Cysteine und zwei Histidine (RING-H2), oder sieben Cysteine und eine Histidin (RING-HC)). Von der RING Domäne werden zwei Zink-Ionen gebunden (Jackson u. Eldridge, 2002), diese Metallkomplexierung ist für die Funktion der E3 Ligase essentiell. Im Gegensatz zu HECT-E3-Ligasen (siehe unten) vermitteln RING-E3-Ligasen nur die Bindung zwischen Substrat und E2-Enzym (Joazeiro u. Weissman, 2000; Jackson u. a., 2000b) und sind an der eigentlichen Ubiquitinierungsreaktion nicht direkt beteiligt. Klassische Beispiele für die Familie der RING-E3-Ubiquitin Ligasen sind die SCF-Proteinkomplexe (benannt nach den Hauptkomponenten Skp1, Cullin und F-box-Protein) und Mdm2, welches am Abbau von p53 beteiligt ist (Honda u. a., 1997; Fang u. a., 2000).

Die zweite Gruppe der E3-Ubiquitin-Ligasen sind die HECT-E3-Ligasen. HECT Domänen-Enzyme sind definiert durch eine etwa 350 Aminosäure lange, zum Carboxyterminus des humanen E6-AP Proteins homologe Sequenz, der HECT Domäne („homologous to the E6-AP C-terminus“, Huibregtse u. a. (1995)). E6-AP wurde als am Abbau des Tumorsuppressors p53 beteiligte E3-Ligase beschrieben (Scheffner u. a., 1990). HECT-E3-Ligasen sind relativ große Proteine (meist 90-500 kDa), die nicht als modulare Multiproteinkomplexe aufgebaut sind. Sie bilden im Gegensatz zu RING-E3-Ligasen direkt Thioesterbindungen mit Ubiquitin aus und übertragen dieses anschließend auf das Substrat (Schwarz u. a., 1998). Die Substraterkennung erfolgt nicht ausschließlich über die HECT-Domäne, sondern in der Regel über andere Domänen der E3 Ligase. Da die HECT-Domänen von verschiedenen Proteinen aber nicht beliebig austauschbar sind, wird angenommen, dass sie ebenfalls in die Substraterkennung involviert sind (Schwarz u. a., 1998). Typisch für HECT E3 Ligasen ist außerdem die WWE-Domäne, die an der Interaktion mit E2 Ligasen und dem Substrat beteiligt ist (Schwarz u. a., 1998).

### 1.4.3. Verschiedene Arten der Ubiquitinierung

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist neben der lysosomalen Degradation eines der zentralen Proteinabbau-Systeme (Rock u. a., 1994), ohne das Zellen nicht überleben können (Tanaka, 1995). Abgebaut werden Proteine im Rahmen des physiologischen Proteinumsatzes. Die schnelle Degradation von Schlüsselenzymen, die für eine Reaktion geschwindigkeitsbestimmend sind (wie zum Beispiel Ornithin-Decarboxylase), Transkriptionsfaktoren die konstitutiv expremiert werden, aber deren Aktivität reguliert werden muss (zum Beispiel p53) und Proteine (zum Beispiel Zykline) deren Aktivität nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus erwünscht ist, spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Metabolismus, Transkriptionsregulation und Zellzyklus Kontrolle (Coux u. a., 1996). Auch werden fehlerhafte Proteine, die durch Mutationen, fehlerhafte Synthese oder Fehlkonformation entstanden sind über durch Lysin 48 verknüpfte Polyubiquitinierung markiert. Diese Polyubiquitinketten sind sowohl wichtig für den Transport zum Proteasom (Deveraux u. a., 1994; Lam u. a., 2002) als auch für die Initiation der Degradation (Haupt u. a., 1997; Kubbutat u. a., 1997). Das Proteasom ist ein Multiproteinkomplex, der in eine katalytische 20S Komponente und zwei regulatorische 19S Komponenten, sogenannte Deckel, gegliedert ist. Die 19S Deckel erkennen mit mindestens vier über Lysin 48 verknüpfte Polyubiquitin Ketten markierte Proteine, entfalten diese und transferieren sie nach Abspaltung der Ubiquitine an die katalytisch aktive, zentrale 20S-Einheit weiter. Diese spaltet Proteine unspezifisch zu kurzen Peptiden, welche zur Neusynthese von Proteinen genutzt werden können. Die Ubiquitine werden nicht gespalten sondern stehen sofort für weitere Ubiquitinierungsreaktionen zur Verfügung.

Die Ubiquitinierung von Proteinen hat nicht zwangsweise Degradation zur Folge. Met4, ein Faktor der bZIP Familie, der Gene der Methioninbiosynthese reguliert, wird bei hohen Mengen von S-Adenosylmethionin durch Ubiquitinierung inaktiviert, aber nicht degradiert (Flick u. a., 2004). Ursache für die Inaktivierung ist zumindest teilweise eine reduzierte Bindungsfähigkeit von ubiquitiniertem Met4 an den Coaktivator Cbp1.

Die Polyubiquitinierung von Proteinen ist nicht homogen. Sie unterscheidet sich einerseits in der Länge der Ubiquitinkette und andererseits in der Art der Verknüpfung innerhalb der Ubiquitinkette: Ketten, die intern über Lysin 48 verknüpft sind und mindestens aus vier Ubiquitinen bestehen, dienen, wie beschrieben, in der Regel als Degradationssignal. Polyubiquitinylierte Spezies mit über Lysin 63 verknüpften Ub-Einheiten, sind für die Vermittlung von nichtproteolytischen, oft reversiblen Ereignissen verantwortlich (Schnell u. Hicke, 2003). Hierzu gehört die

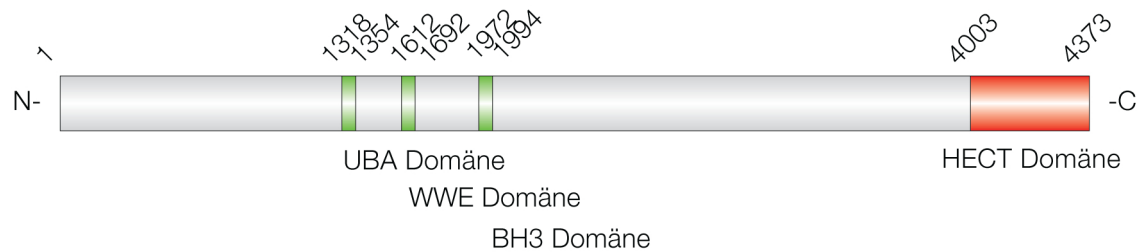
Modulation von Proteineigenschaften wie Aktivität, subzelluläre Verteilung und Protein-Protein-Interaktion. Auch Ubiquitinverknüpfungen über Lysin 11, welche ebenfalls nicht als Degradationssignal wirken, wurden beschrieben (Dubiel u. Gordon, 1999). Ihre genaue Funktion ist unbekannt.

Neben der Polyubiquitinierung spielt auch die Monoubiquitinierung eine wichtige Rolle für die Signaltransduktion der Zelle. Substratmoleküle, auf die nur eine einzelne Ub-Einheit übertragen wird, können durch Proteine mit einer speziellen Ubiquitin-Bindungsdomäne erkannt werden. So dient die Monoubiquitinylierung des Histons H2B im Rahmen des so genannten Histon- Codes als Signal zur Aktivierung der Transkription (Biel u. a., 2005), während sie zum Beispiel bei dem EGF Rezeptor als Signal zur Internalisierung und dem nachfolgenden Transport zum Lysosom dient (Mosesson u. a., 2003).

#### 1.4.4. Die E3-Ubiquitin-Ligase HectH9

In einem Hefe-Zwei-Hybrid-Versuch wurde nach neuen Interaktionspartnern der POZ-Domäne von Miz1 gesucht. Durch Sequenzierung wurden mehrere Klone eines Gens identifiziert, welche alle für die gleiche HECT-E3-Ligase kodieren. Eine cDNA, welche für ein 4374 Aminosäuren langes Protein kodiert, wurde aus mehreren EST („expressed sequence tag“) Klonen ermittelt und mittels RT-PCR und Immunblot verifiziert (Federica Maroni, persönliche Mitteilung). Die Analyse dieser Sequenz zeigt für Ubiquitinligasen typische Domänen: die aus 45 Aminosäuren bestehende UBA Domäne kann sowohl Ubiquitin als auch andere Proteine binden und kommt häufig in Proteinen des Ubiquitin Signalweges vor (Hofmann u. Bucher, 1996). Die WWE-Domäne ist ebenfalls eine Protein Interaktionsdomäne, die typisch für Proteine der Ubiquitinierungskaskade und für ADP ribosylierende Proteine ist (Aravind, 2001). Außerdem wies das neu gefundene Protein eine 371 Aminosäuren lange HECT-Domäne am Carboxyterminus auf, welche charakteristisch für E3-Ubiquitin-Ligasen der HECT Familie ist. Bislang wurden etwa 30 humane HECT-Proteine identifiziert. Da die meisten aber noch nicht charakterisiert sind, werden sie nach einer systematischen Nomenklatur mit HECT H(N) bezeichnet (Scarafia u. a., 2000). Dieser Systematik folgend wird das Produkt im weiteren als HectH9 bezeichnet. In anderen Publikationen geprägten Synonyme sind ArfBP1, E3 Histone, Lasu1, Huwe1 und Mule. Als weiteres Strukturelement enthält HectH9 eine BH3-Domäne. Dies ist eine weitere Protein-Protein Interaktionsdomäne, die Homo- oder Heterodimere mit weiteren Vertretern der Bcl-2-Familie bilden kann. Eine HectH9 „knockout“ Maus wurde bis jetzt noch nicht publiziert, aber Deletion des HectH9 Ortologs in *C. elegans* führt zum Absterben

des Embryos (Page u. a., 2007) was auf eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung schließen lässt.



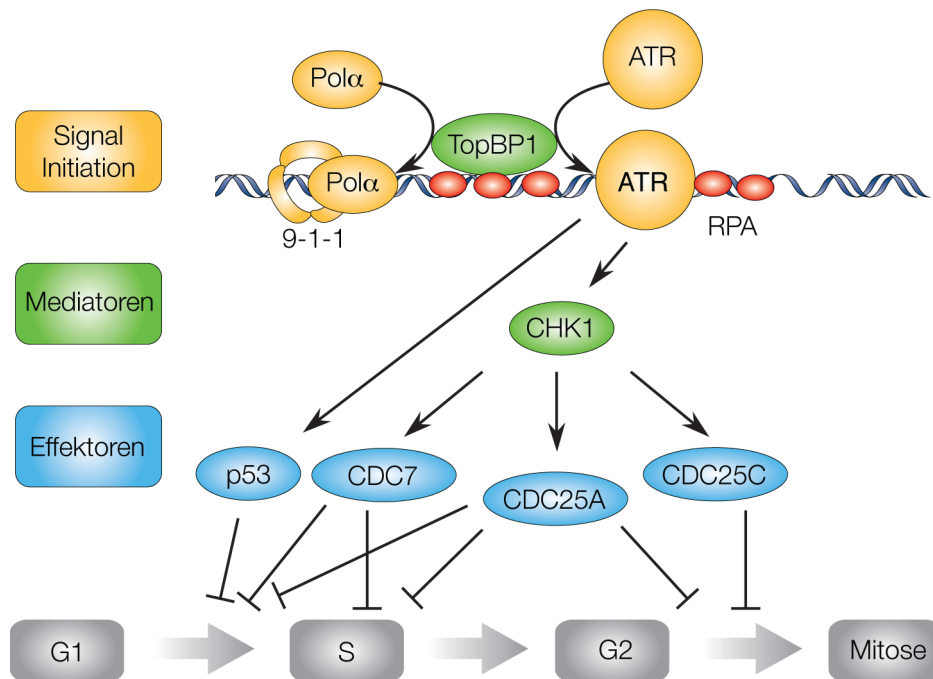
**Abb. 1.6.: Schematische Darstellung des HectH9 Proteins**

Dargestellt sind die einzelnen Domänen des HectH9 Proteins. UBA-Domäne: Protein Interaktionsdomäne, die Ubiquitin erkennt; WWE-Domäne: Protein Interaktionsdomäne, typisch für Ubiquitinierungskaskade und für ADP ribosylierende Proteine; BH3-Domäne: Protein Interaktionsdomäne, typisch für Proteine der Bcl-2 Familie; HECT Domäne: Katalytische Domäne, welche Ubiquitin kovalent bindet und auf Substratmoleküle überträgt.

## 1.5. Das DNA Schadens Reparatursystem

Pro Tag entstehen mehrere tausend DNA Schäden in einer Zelle, die kontinuierlich repariert werden müssen, um die Integrität des Erbguts zu garantieren. Ursachen für DNA Schäden sind sowohl äußere Faktoren wie UV Strahlung oder karzino-gene Chemikalien, als auch endogene Faktoren wie reaktive Sauerstoff Spezies, die im Stoffwechsel anfallen. Dies bedeutet, dass DNA Schaden unvermeidbar für die Zelle ist und deshalb effiziente Regulationsmechanismen für die Erkennung und Reparatur der DNA existieren müssen, um die DNA Integrität vor allem während der Zellteilung zu gewährleisten. Nur so kann eine Weitervererbung von fehlerhaftem Erbmaterial ausgeschlossen werden. Deshalb wird der Ablauf des Zellzyklus von so genannten „Checkpoints“ kontrolliert und kann in jeder Phase verlangsamt oder komplett angehalten werden. Dies gibt der Zelle die benötigte Zeit, den Schaden entweder zu beheben oder, sollte der Schaden zu gravierend sein, den kontrollierten Zelltod einzuleiten. Der „DNA damage checkpoint“, der die Integrität des DNA während der S Phase kontrolliert, wird üblicherweise in drei Komponenten gegliedert: Sensoren, deren Aufgabe es ist, Schaden an der DNA zu erkennen, Mediatoren die das DNA Schadenssignal weiterleiten und verstärken und Effektoren, die Programme zur DNA Schadensreparatur einleiten (zusammengefasst in Kumagai u. Dunphy (2006); Sancar u. a. (2004)). Das DNA Schadenssignal wird durch eine Reihe von Phosphorylierungen weitergeleitet. Zwei Proteinkinasen aus der PI-3-Kinase-ähnlichen Familie, ATM und ATR, haben hierbei eine zentrale Bedeutung bei der DNA Schadensinduktion: ATM wird durch DNA-Doppelstrangbrüche, ATR durch UV-induzierte und replikationsspezifische DNA-Schäden wie z.B. Basendimere aktiviert. Für die vollständige Aktivierung der DNA Schadenskaskade wird die Bindung von weiteren Proteinen wie ATRIP, RPA und dem 9-1-1 Komplex (*Rad9/Rad1/Hus1*) benötigt (Li u. Zou, 2005). Die Signalübertragung übernehmen sogenannte Mediatoren, besonders wichtig sind TopBP1 („*Topoisomerase binding protein 1*“) und BRCA1 („*Breast cancer susceptibility gene 1*“). Diese verstärken das DNA Schadenssignal und vermitteln es mit Hilfe der Kinasen CHK1 und CHK2 das DNA Schadenssignal an die Effektoren wie CDC25 Phosphatasen, p53 und SMC1. Durch sie werden unter anderem die Aktivitäten der Zyklin-abhängigen Kinasen, die den Zellzyklus arretieren aktiviert. So kann der Schaden repariert oder Apoptose eingeleitet werden (Übersicht der DNA Schadenssignalkaskade in Abbildung 1.7).





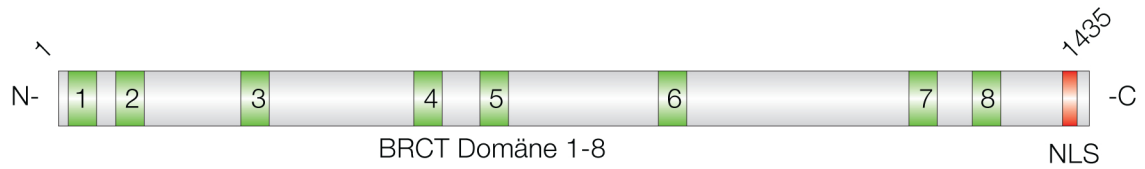
**Abb. 1.7.: Schematische Darstellung des „DNA damage checkpoints“**

In gelb sind die sog. Signalinitiatoren dargestellt, die den von RPA Proteinen (rot) besetzten DNA Schaden erkennen und zusammen mit den Mediatoren (grün) über eine Reihe von Phosphorylierungen die Effektoren (blau) aktivieren. Diese arretieren den Zellzyklus in verschiedenen Phasen (grau) und geben so der Zelle Zeit, den DNA Schaden zu reparieren oder Apoptose einzuleiten.  
(verändert nach Li u. Zou (2005))

### 1.5.1. Der DNA Schadenssignalmediator TopBP1

Das Topoisomerase II-Bindeprotein 1 wurde erstmals durch seine Assoziation mit der Topoisomerase II identifiziert und charakterisiert (Yamane u. a., 1997). Humanes TopBP1 zeichnet sich durch acht carboxyterminalen BRCT Domänen aus. Diese zuerst in BRCA1 beschriebenen Domänen (Koonin u. a., 1996) kommen häufig in Proteinen der DNA Schadensreparatur (zum Beispiel DNA Ligase III und IV, PARP-1) und Schlüsselproteinen der Zellzykluskontrolle (zum Beispiel p53BP, Rad9) vor. TopBP1 hat in der Zelle zwei Hauptaufgaben. Einerseits spielt TopBP1 eine entscheidende Rolle in der DNA Replikation, andererseits ist es für die DNA Schadenserkennung essentiell. TopBP1 assoziiert mit blockierten Replikationsgabeln und bindet Proteine, die eine Rolle in der DNA Schaden Reperatur wichtig sind (Makiniemi u. a., 2001; Yamane u. a., 2002; Perera u. a., 2004). Hier wird es von ATM direkt phosphoryliert (Yamane u. a., 2002) und ist für die effiziente Aktivierung von ATR notwendig (Choi u. a., 2009). Klassische „knockout“

Modelle stehen für TopBP1 nicht zur Verfügung, da es für die DNA Replikation essentiell ist.



**Abb. 1.8.: Schematische Darstellung des TopBP1 Proteins**

Dargestellt sind die 8 BRCT Domänen (1-8, grün) und das carboxyterminale nukleäre Lokalisationssignal (NLS, rot) des TopBP1 Proteins.

## 1.6. Zielsetzung der Arbeit

Myc ist der einzige bekannte Faktor, der sowohl Polymerase I, II und III abhängige Transkription aktivieren als auch über Miz1 Transkription reprimieren kann. Die E3 Ligase HectH9 wurde in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Versuch gefunden, der neue Interaktionspartner von Miz1 identifizieren sollte. Während eine Ubiquitinierung von Miz1 durch HectH9 nicht nachgewiesen werden konnte, ubiquitiniert HectH9 cMyc effizient (Dissertation Rudolph Beier).

Ziel dieser Doktorarbeit war es deshalb, sowohl die Auswirkungen von HectH9 auf cMyc als auch auf Miz1 vermittelte Prozesse mittels Überexpression und Depletion in verschiedenen Systemen zu studieren. Die im Hefe-Zwei-Hybrid Versuch gefundenen Interaktionen von HectH9 und Miz1 sollten im endogenen System mittels Koimmunpräzipitation verifiziert werden. In den folgenden Versuchen wurde cMyc KR6, eine Hexalysin-Mutante von cMyc, die nicht mehr durch HectH9 ubiquitiniert wird, im Vergleich zu wildtyp cMyc verwendet um zu untersuchen, in wie weit die Ubiquitinierung von cMyc durch HectH9 *in vivo* einen degradierenden Einfluss hat. Die Auswirkungen der Überexpression und Depletion von HectH9 auf cMyc und andere Substrate wurde charakterisiert. Des Weiteren wurde untersucht unter welchen Bedingungen HectH9 TopBP1 ubiquitiniert und degradiert.

## 2. Material

### 2.1. Geräte

#### **Begasungsbrutschränke**

BBD 6220 (Heraeus)

#### **Sterilarbeitsbank**

HeraSafe (Heraeus)

#### **Mikroskop zur Betrachtung von lebenden Zellen**

Axiovert 25 (Zeiss, Oberkochen)

#### **Neubauer-Zählkammer**

Neubauer improved (Assistent Germany)

#### **Fotometer zur Messung von Nukleinsäuren**

NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop)

#### **Schüttelinkubator zur Inkubation von Bakterien**

Model G25 (New Brunswick Scientific Co. Inc)

#### **Polyacrylamidgelapparatur**

Biorad Mini-Protean Tetra Elektrophorese System (Biorad)

#### **Tankblot-Apparatur**

(Harnischmacher)

#### **Entwicklermaschine**

Kodak X-OMAT 2000 Processor (Kodak)

#### **Vortexschüttler**

Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)

### **UV Tisch zur Betrachtung von Agarosegelen**

Mini-Transilluminator (Biorad)

### **PCR Maschine**

Eppendorf Thermal Cycler epMaster Gradient S (Eppendorf)

### **quantitative PCR Maschine**

MXp3000P qPCR System (Stratagene) mit MxPro qPCR Software

### **Zentrifugen**

Biofuge pico, Biofuge fresco (Heraeus, Hanau)

Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (Du Pont Instruments)

## **2.2. Einmal- und Plastikware**

Die Plastikwaren für die Zellkultur wurden von den Firmen Nunc oder Greiner bezogen.

### **Zellkulturschalen**

6, 10 und 15 cm Schalen (Nunc bzw. Greiner bio-one)

### **Reaktionsgefäße 1,5 ml/2 ml**

Safe-Lock (Eppendorf)

### **Reaktionsgefäße für Standard PCR**

0,2 ml PCR-Cup, Flat Cap Transparent (Greiner bio-one)

### **Reaktionsgefäße für qRT-PCR**

Micro Amp 0,2ml Optical Tubes; Micro Amp Optical Caps (8 Caps/Strip)  
(Thermo)

### **Probenröhrchen 15 ml**

(Greiner bio-one)

**Probenröhrchen 50 ml**

(Sarstedt)

**Membran**

PVDF Immobilon-P, Porengröße 0,45 µm (Millipore Corp.)

**Objektträger und Deckgläser**

(Roth GmbH, Karlsruhe)

**Parafilm**

Parafilm „M“ (Pechiney Plastic Packaging)

**Einmal-Skalpelle**

Nr. 10 und Nr. 11 (B. Braun)

**Sterile Spritzen- Filter**

30 mm/0,2 µm Whatman (Schleicher und Schüll)

**Spritzen 2 ml**

Injekt Luer Solo 2 ml (B. Braun)

**Insulinspritzen**

Micro-Fine U-40 (Becton Dickinson)

**2.3. Kits**

**Maxi-/Minipräparation**

JetStar 2.0 (Genomed)

**Gelaufreinigung**

QIAEX II DNA Purification Kit (Qiagen)

**DNA Probenaufreinigung**

QIAQUICK PCR Purification Kit (Qiagen)

## 2.4. Bakterien

### Ultrakompetente *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ :

F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80 $\Delta$ lacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA<sup>-</sup>egF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(rk<sup>-</sup>,mk<sup>-</sup>), *phoA*, *supE44*,  $\lambda$ <sup>-</sup>, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

## 2.5. Zelllinien

### HeLa:

Humane Zervixkarzinom-Zelllinie (ATCC)

### NIH-3T3:

immortalisierte Mausembryofibroblasten

### Phönix:

humane Packzelllinie für rekombinante, ekotrophe Retroviren (Grignani u. a., 1998)

### HEK-293:

humane embryonale Nierenzellen

### U2OS:

humane Osteosarkomzelllinie (ATCC)

## 2.6. Sh RNAs

Name	Ziel	Zielsequenz
h_HH9-1	humanes HectH9	ctacaatggtgcaggtaa
h_HH9-2	humanes HectH9	gcagcagtacagacttaa
h_HH9-3	humanes HectH9	ttgtggaggtttcaaataa
m_HH9-1	murines HectH9	ggcagacctgatgtatcaa
m_HH9-2	murines HectH9	gaggacaactagtaataca

## 2.7. Vektoren

### pEGFPC1:

Eukaryontischer Expressionsvektor mit CMV (Cytomegalievirus) Promotor,

gefolgt von einer EGFP kodierenden Sequenz, für die Herstellung von GFP Fusionsproteinen. (Clontech)

**pcDNA3:**

Eukaryontischer Expressionsvektor mit CMV (Cytomegalievirus) Promotor und T7 Promotor (Invitrogen).

**pBABE:**

Vektoren für die Herstellung rekombinanter Retroviren im BOSC / Phoenix System mit zusätzlichen Resistenzgenen gegen Puro- oder Hygromycin (Morgenstern u. Land, 1990).

**2.7.1. Expressionsplasmide zur transienten Transfektion**

**Miz1 in pcDNA3**

pcDNA3 Vektor (Grundvektor von Invitrogen) mit humaner Miz1 cDNA

**wt Myc in pcDNA3**

pcDNA3 Vektor mit humaner cMyc cDNA

**Myc KR6 in pcDNA3**

pcDNA3 Vektor mit humaner cMyc cDNA, in der 6 Lysine (K298, K317, K323, K326, K341 und K355) zu Argininen mutiert wurden.

**HectH9  $\Delta$ N in pcDNA3**

pcDNA3 Vektor mit humanem 3' Ende der HectH9 cDNA von 5718 Basen  
Da wildtyp HectH9 nicht effizient überexprimiert werden konnte wurde für alle Experimente die verkürzte Mutante  $\Delta$ N HectH9, verwendet.

**wt HectH9  $\Delta$ N CS in pcDNA3**

pcDNA3 Vektor mit humaner HectH9 cDNA von 5718 Basen kodiert und in der das katalytische Cystein in der Hect-Domäne durch ein Asparagin ersetzt wurde

**MycKR5 K298 in pcDNA3**

pcDNA3 Vektor mit humaner cMyc cDNA, in der 5 Lysine (K317, K323, K326, K341 und K355) zu Argininen mutiert wurden



**MycKR5 K341 in pcDNA3**

pcDNA3 Vektor mit humaner cMyc cDNA, in der 5 Lysine (K298, K317, K323, K326 und K355) zu Arginginen mutiert wurden

**HA-Ubiquitin in pcDNA3**

pcDNA3 Vektor HA markierter Ubiquitin cDNA

**His-Ubiquitin in pcDNA3**

pcDNA3 Vektor mit HexaHis markierter Ubiquitin cDNA

**wt TopBP1 pcDNA3**

pcDNA3 Vektor mit humaner TopBP1 cDNA

**wt FLAG TopBP1 pcDNA3**

pcDNA3 Vektor mit humaner, FLAG markierter TopBP1 cDNA

**FLAG TopBP1 S1159A pcDNA3**

pcDNA3 Vektor mit humaner, FLAG markierter TopBP1 cDNA, in der Lysin 1159 zu Alanin mutiert wurde

**HectH9-HA $\Delta$ 5 in pEGFPC1**

pEGFPC1 Vektor mit humanem, HA markierter HectH9 Carboxyterminus von 2412 bp Länge

**HectH9-HA $\Delta$ 4 in pEGFPC1**

pEGFPC1 Vektor mit humanem, HA markierter HectH9 Carboxyterminus von 2352 bp Länge

**HectH9-HA $\Delta$ 3 in pEGFPC1**

pEGFPC1 Vektor mit humanem, HA markierter HectH9 Carboxyterminus von 1791 bp Länge

**HectH9-HA $\Delta$ 2 in pEGFPC1**

pEGFPC1 Vektor mit humanem, HA markierter HectH9 Carboxyterminus von 1692 bp Länge

**HectH9-HA $\Delta$ 1 in pEGFPC1**

pEGFPC1 Vektor mit humanem, HA markierter HectH9 Carboxyterminus von 1644 bp Länge

**HectH9-HA $\Delta$ 5 S3816A T2822A in pEGFPC1**

pEGFPC1 Vektor mit humaner, HA markierter HectH9 $\Delta$ 5 cDNA, in der Treonin 3816 und Serin 3822 von HectH9 zu Alanin mutiert wurden.

**2.7.2. Expressionsplasmide zur Erzeugung rekombinanter Retroviren**

**pBABE-Puro Myc:**

pBABE-Puro Vektor mit humaner cMyc cDNA

**pBABE-Puro Myc KR6:**

pBABE-Puro Vektor mit humaner cMyc cDNA, in der 6 Lysine (K298, K317, K323, K326, K341 und K355) zu Argininen mutiert wurden.

**pBABE-Hygro Myc ER:**

pBABE-Hygro Vektor mit humaner cMyc und Estrogenrezeptor cDNA. Dieses Myc-Konstrukt lässt sich durch Zugabe von 4-OHT induzieren.

## 2.8. Antikörper

Name	Epitop	Hersteller	Spezies	Verdünnung
N262	Myc	Santa Cruz	Kaninchen	1:3000 in 5 % MM
9E10	Myc	AG Eilers	Maus	1:1000 in 5 % MM
10E2	Miz-1	AG Eilers	Maus	1:500 in 5 % MM
HA.11	HA	Covance	Maus	1:5000 in 5 % MM
H190	Miz1	Santa Cruz	Kaninchen	1:3000 in 5 % MM
Cdk2	Cdk2	Santa Cruz	Kaninchen	1:3000 in 5 % MM
Tubulin	Tubulin	Santa Cruz	Maus	1:3000 in 5 % MM
DO-1	p53	Santa Cruz	Maus	1:1000 in 5 % MM
NB 100-217	TopBP1	Novus	Kaninchen	1:5000 in 5 % MM
HectH9	HectH9	AG Helin	Maus	1:1000 in 5 % MM
H-300	ATR	Santa Cruz	Kaninchen	1:1000 in 5 % MM
FL-476	Chk1	Santa Cruz	Kaninchen	1:2000 in 5 % MM
MAB3806	ATM p-S1981	Chemicon	Maus	1:5000 in 5 % MM
Ser15-R	p53 p-S15	Santa Cruz	Kaninchen	1:2000 in 5 % BSA
Anti Maus	Alexa Fluor 647	Invitrogen	Kaninchen	1:400 in PBS
Anti Maus	Alexa Fluor 488	Invitrogen	Kaninchen	1:400 in PBS
Anti Maus	Maus IG	Millipore	Ziege	1:25000 in TBS-T
Anti Kaninchen	Kaninchen IG	Millipore	Ziege	1:25000 in TBS-T

Alle Primärantikörper wurden mit 1:1000 0,5%iger Natriumazid Lösung stabilisiert, bei 4 °C aufbewahrt und mehrfach benutzt.

## 2.9. qRT-PCR Primer

Name	Ziel	Sequenz
qPCR_HectH9_5'	HectH9 cDNA	ccagaagttcttcttgagggtact
qPCR_HectH9_3'	HectH9 cDNA	gcctaaaccggaggaacc
Dx18_for	ENSMUST00000001724	tgaaaaaggcagatgacagc
Dx18_rev	ENSMUST00000001724	aatgaagtgtcctcaaaagcac
Fos11_for	ENSMUST00000025850	cccagtacagtccccctca
Fos11_rev	ENSMUST00000025850	tcctcctctgggctgatct
Hmox1_for	ENSMUST00000005548	ggtcagggtgtccagagaagg
Hmox1_rev	ENSMUST00000005548	cttccagggcgtgtagata
Ier3_for	ENSMUST00000003635	gccgaagggtgctctacc
Ier3_rev	ENSMUST00000003635	aatctggcagaagatgatgg
Mcm3_for	ENSMUST00000053266	tgaggatgcaccaatacagg
Mcm3_rev	ENSMUST00000053266	aactaccaatggcaaagca
Mthfd2_for	ENSMUST00000005810	ccgccagtcactcctatggt
Mthfd2_rev	ENSMUST00000005810	cacaattgtctcactgttgattcc
Txnrd1_for	ENSMUST00000020484	gcagcagctaaggcaagact
Txnrd1_rev	ENSMUST00000020484	cgggtgtgacaaaatccaaga
Ptma_for	ENSMUST00000045897	ggataccagctccgagatca
Ptma_rev	ENSMUST00000045897	ttcctcattttgagcgttcc
Ccnb1_for	ENSMUST00000072119	tgcattttgctccttctcaa
Ccnb1_rev	ENSMUST00000072119	caggaagcaggagtgcttca
Ccna2_for	ENSMUST00000029270	cttggtgcaccaacagtaa
Ccna2_rev	ENSMUST00000029270	caaactcagttctccaaaaaca

## 2.10. Mutagenese Primer

Name	Ziel	Sequenz
Myc R298K fw	R 298 von Myc KR6 zu K	cctcacagcccactggctctcaagaggtgccacg
Myc R298K rev	R 298 von Myc KR6 zu K	cgtggcacctcttgaggaccagtgggctgtgagg
Myc R341K fw	R 341 von Myc KR6 zu K	cagcaacaaccgaaaatgcaccagccccaggtcctc
Myc R341K rev	R 341 von Myc KR6 zu K	gaggacctggggctggtgcattttcggttgtgtgctg

## 2.11. Klonierprimer

Name	Sequenz
HectH9-HA $\Delta$ 5 in pEGFPC1 (BglII)	gggagatctGCCACCATGgtgtcctctggcctcactgaa aacc
HectH9-HA $\Delta$ 4 in pEGFPC1 (BglII)	gggagatctGCCACCATGtcttgttctgaggaaggctta gagg
HectH9-HA $\Delta$ 3 in pEGFPC1 (BglII)	gggagatctGCCACCATGgtacgtgagggtcaaagggc gcgg
HectH9-HA $\Delta$ 2 in pEGFPC1 (BglII)	gggagatctGCCACCATGgtggaccagccatctccca gtgc
HectH9-HA $\Delta$ 1 in pEGFPC1 (BglII)	gggagatctGCCACCATGgatggaacccacaggggga gaagg
HectH9 HA Stopp Primer (SalI)	cccgctgacttatgcataatctggtacatcatatggataggcca gcccaaagccttcagagca

## 2.12. Chemikalien

Sämtliche verwendeten Chemikalien waren, soweit nicht anders angegeben, von analysenreiner Qualität. Die hier nicht aufgeführten Stoffe wurden von den Firmen Fisher Scientific GmbH (Nidderau), Merck KGaA (Darmstadt), Roth GmbH (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA) bezogen.

### Acrylamidstammlösung (AppliChem)

30 % (w/v) Acrylamid

0,8 % (w/v) Bisacrylamid

### dNTPs (Roth)

Stammlösung je 100 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP

### RNasin plus (Promega)

40 U/ $\mu$ l

### Ammoniumpersulfat (APS) (Sigma)

10 % (w/v) in H<sub>2</sub>O

**TEMED**

Applichem

**Ampizillin** (Sigma)

100 mg/ml

**NEM** (Merck KGaA)

20 mM gelöst in 100 % Ethanol;

eingesetzt 1:1000

**ALLN** (Merck KGaA)

20 mM gelöst in 100 % Ethanol;

eingesetzt 1:1000

**MG132** (Merck KGaA)

20 mg/ml, gelöst in 100 % Ethanol;

eingesetzt 1:1000

**Protease Inhibitoren Cocktail** (Sigma)

20 mg/ml gelöst in Dimethylsulfoxid;

eingesetzt 1:1000

**Ethidiumbromid** (Roth)

4 % in H<sub>2</sub>O

**Propidiumiodid** (Roth)

4 % in H<sub>2</sub>O

**Protein G Sepharose, Fast Flow** (Sigma)

**Protein A Sepharose, Fast Flow** (Sigma)

**Talon Cobalt Agarose, Fast Flow** (Takara)

### 2.13. Materialien für die Zellkultur

#### **DMEM-Zellkulturmedium** (Cambrex)

Zur Herstellung einer gebrauchsfertigen Lösung mit 10% FCS (v/v), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzen.

#### **Trypsin** (Cambrex)

89% kaltes 1×TBS

10% 10×Trypsin

1% 0,5 M EDTA

#### **Penizillin/Streptomycin, 100×** (Invitrogen Corp., Carlsbad, USA)

10000 U/ml, Penizillin G

10 mg/ml Streptomyzinsulphat

#### **PBS**

130 mM NaCl

3 mM KCl

6,4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

eingestellt auf pH 7,4 mit HCl

#### **Puromycin** (Invivogen)

1 µg/ml Endkonzentration

#### **Hygromycin B** (Calbiochem)

500 µg/ml Endkonzentration

### 2.14. Medien für Bakterien

#### **LB-Medium**

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O, eingestellt auf pH 6,8

**LBA-Medium**

10 g Trypton  
5 g Hefeextrakt  
10 g NaCl  
100 µg/ml Ampizilin  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O, eingestellt auf pH 6,8

**LBA-Agar**

LB-Medium  
1,5 % (w/v) Bacto-Agar  
100 µg/ml Ampizilin

**2.15. Puffer**

**3×SDS Auftragspuffer:**

7,5 ml β-Mercaptoethanol  
15 ml Glycerol  
3 g SDS  
9,375 ml 1M Tris pH 6,8  
50 mg Bromphenolblau  
mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 ml auffüllen.

**Bradford Lösung:**

100 mg Coomassie BlueG  
48 ml Ethanol  
100 ml 85 % Ortho-Phosphorsäure  
auf 1 l mit ddH<sub>2</sub>O (852 ml) auffüllen  
über Nacht rühren (vor Lichteinfall schützen)  
durch einen Faltenfilter filtrieren und lichtgeschützt aufbewahren.



**2×HBS:**

280 ml 5M NaCl

59,6 g Hepes

7,5 ml 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

auf 5l mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

pH auf 7,05 einstellen

mit einer 0,22 µm Filtriereinheit filtrieren, aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren;

**NP40 Lyse-Puffer:**

7,5 ml 5 M NaCl

2,5 ml NP40

12,5 ml 1 M Tris pH8,0

mit ddH<sub>2</sub>O auf 250ml auffüllen

Vor Verwendung frisch PI zugeben;

**10×Tank-Blot Puffer:**

319,4 g Glycin (75,07 MW)

75,00 g Tris Base (121,14 MW)

6,25ml 10 % SDS Lösung

ad 2,5l mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen

auf ca pH 8 mit HCl einstellen (ca 40ml)

**1×Tank-Blot Puffer:**

10×Tank-Blot Puffer mit ddH<sub>2</sub>O und einer Endkonzentration von 15 % v/v Methanol auf 1×verdünnen;

**6×DNA-Probenpuffer**

40 % (w/v) Saccharose

0,2 % (w/v) Orange G 10 mM EDTA pH 8,0

**Laufpuffer für SDS Gelelektrophorese**

25 mM Tris/HCl pH 8,3

0,2 M Glycin

0,1 % (w/v) SDS

**TAE-Puffer**

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

**Tris pH 8,0 (1 M)**

1 M Tris in ddH<sub>2</sub>O  
eingestellt auf pH 8,0

**20×TBS**

1 M Tris/HCl pH 7,8  
3 M NaCl

**TBS-T**

1×TBS  
0,2% (v/v) Tween-20

**Ubi-Puffer 1:**

50 mM Tris-Cl pH 7,5  
120 mM NaCl  
5 mM EDTA  
1 % SDS

Vor Verwendung frisch ALLN, PI, NEM und MG132 zugeben;

**Ubi-Puffer 2:**

50 mM Tris-Cl pH 7,5  
120 mM NaCl  
5 mM EDTA

Vor Verwendung frisch ALLN, PI, NEM und MG132 zugeben;

**His Ubi-Puffer 1:**

50 mM Phosphatpuffer pH 7,5  
120 mM NaCl  
6 M Guanidinium Hydrochlorid

Vor Verwendung frisch ALLN, PI, NEM und MG132 zugeben;

**His Ubi-Puffer 2:**

50 mM Phosphatpuffer pH 7,5

120 mM NaCl

3 M Guanidinium Hydrochlorid

Vor Verwendung frisch ALLN, PI, NEM und MG132 zugeben;

**His Ubi-Puffer 3:**

50 mM Phosphatpuffer pH 7,5

120 mM NaCl

Vor Verwendung frisch ALLN, PI, NEM und MG132 zugeben;

**His Ubi-SDS Puffer:**

1 ml 3×SDS Auftragspuffer

0,5 ml 1 M Imidazolösung

1,5 ml H<sub>2</sub>O

## 2.16. Molekulargewichtsstandards

**1kb DNA-Marker**

1 kb DNA Ladder 1µg/µl (Invitrogen)

**Proteinmarker**

Page Ruler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder (Fermentas)

HiMark Prestained Protein Ladder (Invitrogen)

## 3. Methoden

(Auszüge und Übersetzungen aus der Methodensammlung der AG Eilers)

### 3.1. Nukleinsäure Techniken

#### **Polymerasekettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion wurde zur Amplifikation spezifischer Fragmente aus geringen Mengen DNA angewandt. Ein bestimmter Bereich eines DNA-Doppelstranges, der als Vorlage („Template“) dient, wurde mit Hilfe zweier „Primer“, die zu den Enden des zu amplifizierenden Fragmentes komplementär waren, durch eine amplifiziert (Mullis u. Faloona, 1987). Für die PCR Reaktionen in dieser Arbeit wurden je nach „Template“ 50 bis 100 ng DNA pro PCR-Reaktion und „Primer“ mit einer Schmelztemperatur 50-65 °C eingesetzt. Die Reaktionstemperaturen und -zeiten wurden auf den jeweiligen Primersequenzen und der Länge der erwarteten Produkte basierend errechnet. Die PCR Reaktionen wurden generell nach Angaben der Hersteller durchgeführt. Hier ein typischer PCR Ansatz: 100 ng „Template“; 1 µl Taq-Polymerase; 5 µl 10 × PCR-Puffer (Roche); 0,2 mM je dNTP (Invitrogen); Primer 1 und 2 je 10 pM; mit ddH<sub>2</sub>O auf 50 µl auffüllen.

#### **Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

Die Aufreinigung der mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte nach dem Protokoll der Firma Qiagen mittels des „QIAquick PCR-Purification-Kit“. Es wurde ein 50 µl PCR Ansatz mit 250 µl PB-Puffer gemischt, auf eine Mikrozentrifugationssäule gegeben und 1 Minute zentrifugiert. Danach wurde die Säule mit der gebundenen DNA nach den Angaben des Herstellers mit PE-Puffer gewaschen, getrocknet und mit Elutions-Puffer (10 mM Tris pH 8,0) eluiert.

#### **Verdau von DNA**

DNA aus PCR-Reaktionen oder Plasmid-DNA wurde mittels verschiedener DNA-Restriktionsendonukleasen verdaut. Dafür wurde 5 µg DNA mit 10 Einheiten des entsprechenden Enzyms (von New England Biolabs oder Fermentas) in einem Gesamtvolumen von 50 µl nach der vom Hersteller empfohlenen Puffer-

und Temperaturbedingungen 1 bis 2 Stunden inkubiert.

### **Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Um nach einem Restriktionsverdau der entsprechenden Vektoren eine Religation zu verhindern, wurden die verdauten Vektoren an den Enden dephosphoryliert. Der Verdau wurde dafür nach Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme für 20 Minuten bei 65 °C (sofern eine Hitzeinaktivierbarkeit des Enzyms vorlag) mit 10 Einheiten der alkalischen CIP (Calf Intestinal Phosphatase) (NEB) für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert und mit dem „QIAquick PCR-Aufreinigungs“-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

### **Elektrophoretische Auftrennung von DNA**

DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und isoliert. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1×TAE verwendet, dem zur Visualisierung der DNA Ethidiumbromid (circa 10 ng/ml) zugesetzt wurde. In Abhängigkeit der Länge des DNA Fragments wurden Agarosegele mit Konzentrationen zwischen 0,7-2,5 % verwendet.

### **DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen**

Nach der Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente mittels UV Monitor (312 nm) sichtbar gemacht, mit einem Skalpell ausgeschnitten, gewogen und mittels des „QIAquick Gel Extraction“-Kits (Qiagen) aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wurde ein Aliquot der DNA elektrophoretisch aufgetrennt, um die Reinheit des eluierten Fragments zu bestimmen und anschließend photometrisch vermessen.

### **DNA-Ligation**

Für DNA-Ligationen mit 3'- oder 5'-Überhängen wurden Vektor und das einzubringende DNA-Fragment in einem Verhältnis von 1:3, für Ligationen ohne überhängende Enden (Blunt) in einem Verhältnis 1:10 gemischt. Es wurden insgesamt nicht mehr als 200 ng DNA für eine Ligation in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Für die Ligation wurden 1 µl T4-DNA-Ligase (New England Biolabs (NEB), 2000 Einheiten/µl) eingesetzt. Die Reaktion im Ligationpuffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1mM ATP, 25 µg/ml BSA) erfolgte über Nacht bei 16 °C.

### ***Escherichia coli*-Transformation mit rekombinanter DNA**

Ein 2 µl Aliquot des Ligationsansatzes wurde in kompetente *E.coli* DH5α Zellen transformiert. Die Transformation der Zellen wurde nach (Sambrook u. a., 1989) durchgeführt. Danach folgte eine 45 minütige Inkubation bei 37 °C in LB Medium ohne Antibiotikum und ein Ausplattieren der Ansätze auf entsprechende Kulturplatten unter Selektion.

### **Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli***

Ausgehend von einer Kolonie wurde eine Übernachtskultur in 5 ml LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angesetzt und am nächsten Tag durch Zentrifugation pelletiert. Die Lyse der Zellen und die Plasmidisolierung wurden mit den Puffern des Plasmidisolations-Kits (Jetstar), nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. 2 µl der Plasmid-DNA wurden dann mittels geeigneter Restriktionsenzyme verdaut und auf das korrekte Insert hin geprüft.

### **Subklonierung von DNA-Fragmenten**

Die Vorgehensweise entspricht der beschriebenen Klonierung von PCR-Produkten. Bei Subklonierungen von DNA-Fragmenten wurde das DNA-Fragment enzymatisch aus einem Plasmid herausgeschnitten und gereinigt.

### **RNA Isolation**

Je nach weiterer Verwendung wurde die RNA aus Zellen mittels TRIzol Reagenz oder durch Nutzung des NucleoSpin-Kits von Machery-Nagel isoliert. RNA, die nachfolgend zur cDNA-Synthese und dann für Analysen mittels quantitativer Realtime-PCR (qRT-PCR) genutzt werden sollte, wurde mittels TRIzol Reagenz nach Angaben des Herstellers isoliert und aufgereinigt. Das Nucleospin-Kit von Machery-Nagel wurde verwendet, wenn RNA als Ausgangsmaterial für einen cDNA-Microarray benötigt wurde. Die Isolation und Aufreinigung der RNA

erfolgte dabei nach Herstellerangaben.

### **cDNA-Microarray**

Der cDNA-Microarray wurde von der Microarray-Service-Einheit des IMT durchgeführt. Dabei wurden jeweils 55 µg RNA zunächst in cDNA revers transkribiert, aufgereinigt und anschließend mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 markiert. Die fluoreszierenden cDNA-Proben wurden aufgereinigt und über Nacht zwischen zwei cDNA-Microarray-Chips gegeben (Sandwich). Auf diesen Chips befanden sich 11552 einzelsträngige, humane cDNAs, die mit entsprechenden fluoreszenz-markierten cDNA-Proben hybridisieren konnten. Nach dem Waschen der Chips wurden die Daten eingelesen und von Birgit Samans ausgewertet.

## **3.2. Zellkultur**

Die Arbeiten mit eukaryontischen Zellkulturen orientierten sich im wesentlichen nach Standardmethoden, wie sie zum Beispiel bei Spector (1998) beschrieben sind. Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden in Adhäsionskultur auf Polystyrol-Zellkulturschalen mit den Durchmessern 3,5 cm, 6 cm, 10 cm oder 15 cm kultiviert (Nunc, Greiner). Wenn nicht speziell vermerkt, wurden die Zellen in Vollmedium in Heraeus BBD 6220 Begasungsbrutschränken bei 37 °C, 96 % relativer Feuchte und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Experimente, die für eine fortgesetzte Kultur vorgesehen waren, wurden unter sterilen Bedingungen in einer Steril-Arbeitsbank (HeraSafe, Heraeus) durchgeführt.

### **Auftauen von Zellen**

Ein Aliquot (ca. 1 ml) eingefrorener Zellsuspension wurde in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, sofort in einem 15 ml-Falcon-Röhrchen in einem Gesamtvolumen von 10 ml auf 37 °C vorgewärmtem Vollmedium aufgenommen und 3 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml auf 37 °C vorgewärmtem DMEM (mit 10 % FCS (v/v), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) resuspendiert und die Suspension über Nacht in einer 10 cm Schale bei 37 °C im Brutschrank unter 5 % CO<sub>2</sub> (v/v) inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt um Reste von DMSO zu entfernen.

### **Transfektion von Zellen mit Kalziumphosphat**

Zellen wurden mit einer Neubauer Zählkammer ausgezählt und jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen auf einer 10 cm Zellkulturschale ausplattiert. Am darauf folgenden Tag wurde je Schale 30 µg Plasmid-DNA und 50 µl 2,5 M Calciumchloridlösung in einem Röhrchen gemischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 500 µl aufgefüllt. über „Bubbeln“ (Luftzufuhr über eine Glaspipette) langsam in ein zweites Röhrchen mit 500 µl 2×HBS überführt. Dieser Ansatz wurde 1 bis 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und das so entstandene feine Präzipitat auf die Schalen gegeben. Nach 12 bis 16 Stunden wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend weitere 24 bis 36 Stunden in Kultur gehalten. Danach wurden sie in 1 ml PBS geerntet.

### **Herstellung rekombinanter Retroviren**

Der retrovirale Gentransfer ermöglicht die stabile Integration von Plasmid-DNA in das Genom von Säugerzellen. Sogenannte pBABE Plasmide (Morgenstern u. Land, 1990) in die die entsprechenden cDNA Sequenzen kloniert wurden, dienten als Vektoren. Für die Transfektion der „Phoenix-Packaging-Zelllinie“ wurden auf einer 10 cm Kulturschale  $5-6 \times 10^6$  Zellen plattiert und nach 24 Stunden mit 30 µg DNA mit der Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Am nächsten Morgen (12-14 Stunden nach Transfektionsbeginn) wurden die Zellen 1 mal mit PBS gewaschen und mit 5 ml neuem Medium versetzt. Nach 24 Stunden wurde der Virusüberstand abgenommen und für 5 Minuten in einer Heraeus-Megafuge bei 1200 U/min und 4 °C abzentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen (1. Ernte). Danach wurde der Überstand in 7 ml-Aliquots in flüssigem Stickstoff (Messer-Griesheim, Griesheim) schockgefroren und bis zur Infektion bei -80 °C gelagert. Die Phoenix-Zellen wurden erneut mit 5 ml Medium versetzt und der Überstand nach weiteren 24 Stunden geerntet (2. Ernte) und eingefroren.

### **Infektion von Zellen mit rekombinanten Retroviren**

Einen Tag vor der Infektion wurden  $5 \times 10^5$  Zellen auf eine 10 cm Kulturschale ausplattiert. Zur Infektion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 3-6 ml viralem Überstand versetzt. Außerdem wurden 2 ml Medium (wenn nur 3ml Virusüberstand verwendet wurde) und zur Erhöhung der Infektionseffizienz 4 µg/ml Polybrene (Hexadimethrinbromid, Sigma) zu den Zellen gegeben. Es folgte ein Inkubationsschritt bei 37 °C im Brutschrank für 12-16 Stunden. Danach wurden 5 ml Medium zugegeben. Schließlich wurden die Zellen 48 Stunden nach Infektionsbeginn mit dem entsprechenden Antibiotikum selektioniert.



### **Selektion antibiotikumresistenter Zellen**

Zur stabilen Integration von rekombinanten Retroviren wurden die Zellen 48 Stunden nach Infektion in das entsprechende Selektionsmedium überführt (5 µg/ml Puromycin) und bei Bedarf weiterpassagiert. Mittels Zellen, denen das jeweilige Resistenzgen fehlte, wurde die Vollständigkeit der Selektion überprüft. Das Selektionsmedium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt.

## **3.3. Proteinbiochemische Methoden**

### **Endogene Koimmunpräzipitation**

Zellen wurden mit NP40 Puffer resuspendiert, durch 3 faches Schockfrieren und Auftauen lysiert und durch Bestimmung nach Bradford die Proteinkonzentration ermittelt. Für die Koimmunpräzipitation wurde jeweils 1 mg Protein eingesetzt. 25 µg Protein G Sepharose „Beads“ wurden drei mal mit NP40 Puffer waschen. Die gewaschene Protein G Sepharose wurde mit 1 % BSA in 1 ml NP40 Puffer 30 Minuten bei Raumtemperatur drehend blockiert. Blockierte „Beads“ wurden mit je 1 µg Antikörper und je 1 mg Lysat gemischt und mit NP40 Puffer auf 1 ml aufgefüllt. Die Ansätze wurden nun 2 Stunden bei Raumtemperatur über Kopf auf einem Rad gedreht. Danach wurde jeder Ansatz 5 mal auf Eis mit NP40 Puffer gewaschen. Dabei wurde nach dem vierten Waschschriff das Eppendorf-Gefäß gewechselt. Zum Schluss wurde das gebundene Protein mit 1×SDS-Puffer eluiert und ein Immunblot durchgeführt.

### **Immunfluoreszenz**

Für die Immunfluoreszenz wurden  $2,5 \times 10^5$  HeLa Zellen in 6 cm Platten auf Deckgläsern kultiviert und transfiziert. Die Zellen wurden nach 12 Stunden einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt, und nach weiteren 24 Stunden in Kultur mit PBS gewaschen und mit 3,7 % Paraformaldehyd für 15 Minuten fixiert. Danach wurde zweimal mit PBS gewaschen. Blockiert wurden die Zellen mit 10 % BSA in PBS für 45 Minuten bei Raumtemperatur. Die Erstantikörper wurden in Blockpuffer (1:250) verdünnt und für 45 Minuten bei 37 °C auf den Zellen inkubiert. Diese wurden anschließend dreimal mit dem Blockpuffer bei Raumtemperatur für fünf Minuten gewaschen, bevor der Zweitantikörper (1:400) sowie Höchst 33258 Farbstoff (1:10000) für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf den Zellen inkubiert wurde. Anschließend wurden die

Deckgläser mit NP-40-Waschpuffer drei mal fünf Minuten bei Raumtemperatur gewaschen, in PBS und H<sub>2</sub>O getaucht, abgetupft und mit 2 µl Mowiol eingedekelt.

### **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die SDS-PAGE wurde wie von (Sambrook u. a., 1989) beschrieben durchgeführt. Die Elektrophorese wurde zunächst bei 80 Volt und nach Einlauf ins Trenngel bei 160 Volt in einer Elektrophoreseapparatur (Biorad) durchgeführt (Gelgröße 1 mm×7 cm×10 cm). Abhängig von der Größe der Proteine, die dargestellt werden sollten, wurde die Elektrophorese nach 1 bis 3 Stunden beendet und das Gel geblottet.

### **Immunblot**

Für Immunblot Analysen erfolgte der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine in einer Harnischmacher Blotting-Apparatur. Dafür wurde das Gel im Sandwichverfahren auf eine PVDF Membran, die zuvor für 5 Minuten in Methanol inkubiert wurde, bei 350 - 400 mA für 1 bis 4 Stunden, abhängig von der Proteingröße in Transferpuffer geblottet. Nach dem Blot wurde die Membran, um den Transfer zu überprüfen, für 10 Sekunden in Ponceau-S-Lösung (Sigma) geschwenkt und für eine Minute in H<sub>2</sub>O entfärbt.

Unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper an transferierten Proteinen auf der PVDF-Membran wurden durch einstündige Inkubation mit 5% Milchpulver in TBS-T abgesättigt. Der Primärantikörper wurde im 5% Blockmilch entsprechend verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Die Membran wurde dreimal je 15 Minuten mit TBS-T-Puffer gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit Peroxidase gekoppeltem Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde die Membran fünf mal für jeweils 5 Minuten in TBS-T gewaschen und mit „Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat“ (Millipore) nach Angaben des Herstellers inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit Frischhaltefolie abgedeckt. In einer Dunkelkammer wurde je nach Intensität der Film nach 3 Sekunden bis zu einer Stunde Exposition entwickelt.

### **HA-Ubiquitinierungs-Assay**

Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml eiskaltem PBS geerntet. 50 µl der Zellsuspension wurden für einen Immunblot abgenommen. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 3000 U/min wurde

der Überstand abgesaugt und das Pellet in 100 µl Ubi-Puffer 1 resuspendiert und für 7 Minuten bei 95 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Ubi-Puffer 2 wurde die Probe für 10 Minuten mit 13000 U/min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die so erhaltenen Lysate wurden nun über Nacht mit 20 µl αHA „Sepharose-Beads“ inkubiert. Nach 3 Waschschritten wurden die „Beads“ in 50 µl 1×SDS Ladepuffer für 10 Minuten aufgekocht und anschließend im Immunblot analysiert.

### **His-Ubiquitinierungs-Assay**

Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml eiskaltem PBS geerntet. 50 µl der Zellsuspension wurden für einen Immunblot abgenommen. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 3000 U/min wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml His Ubi-Puffer 1 resuspendiert und für 5 ×30 Sekunden bei 20% Amplitude sonifiziert. Anschließend wurde das Lysat mit 50 µl vorher gewaschenen Talon „Beads“ für 2 Stunden bei 4 °C über Kopf auf einem Rad gedreht. Danach wurde jeder Ansatz je 2 mal auf Eis mit His Ubi Puffer 1 2 und 3 gewaschen. Zum Schluss wurde das gebundene Protein mit His Ubi SDS-Puffer eluiert und ein Immunblot durchgeführt.

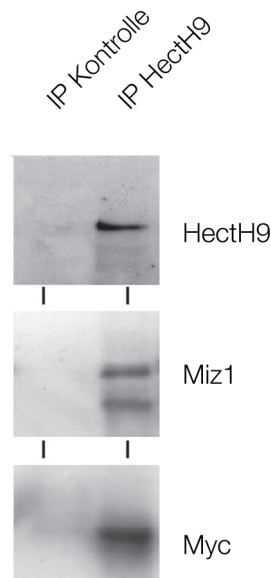
### **FACS Analyse**

Die Zellen wurden zunächst trypsinisiert und in 10 ml PBS in Sarstedt-Röhrchen überführt. Daraufhin wurden die Zellen in einer Heraeus-Megafuge bei 1200 U/min und 4 °C für 5 Minuten abzentrifugiert und einmal in PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 0,5 ml PBS resuspendiert und mit 4,5 ml eiskaltem Ethanol zur Fixierung zugegeben und mindestens 30 Minuten auf Eis stehend fixiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, in 0,5 ml PBS / 0,1% NP40 aufgenommen und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 500 µl PBS / 30 µg/ml Propidiumjodid und 20 µg/ml RNase A (Boehringer) für eine Stunde bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt inkubiert. Mit einem Becton-Dickinson FACScalibur-Gerät wurde der DNA-Gehalt pro Zelle bestimmt. Um statistisch robuste Werte zu erhalten, wurden pro Ansatz 50000 bis 100000 Zellen analysiert. Die erhaltenen Daten wurden unter Verwendung des Programms „Modifit“ (Verity Software House) ausgewertet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. HectH9 bindet Miz1 und cMyc *in vivo*

HectH9 wurde in einem Hefe-Zwei-Hybrid Versuch als Interaktionspartner von Miz1 gefunden (Dissertation Rudolph Beier). Deshalb wurde mittels endogener Koimmunpräzipitation überprüft, ob diese Interaktion auch in Säugerzellen nachweisbar ist. Hierzu wurden exponentiell wachsende HeLa Zellen geerntet, Proteinlysate erstellt, und diese mit an Protein G-Sepharose gekoppelten HectH9- oder Kontrollantikörpern inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurden die präzipitierten Proteine eluiert und mittels Immunblot für HectH9, Miz1 und cMyc analysiert. In der anti HectH9 Immunpräzipitation (Abbildung 4.1, Spur 2) sind HectH9, Miz1 und cMyc zu detektieren (Abbildung 4.1, Spur 1). Im Gegensatz hierzu ist in der Kontrollimmunpräzipitation kein Signal erkennbar. Dies bedeutet, dass HectH9 endogen spezifisch mit Miz1 und cMyc interagiert.



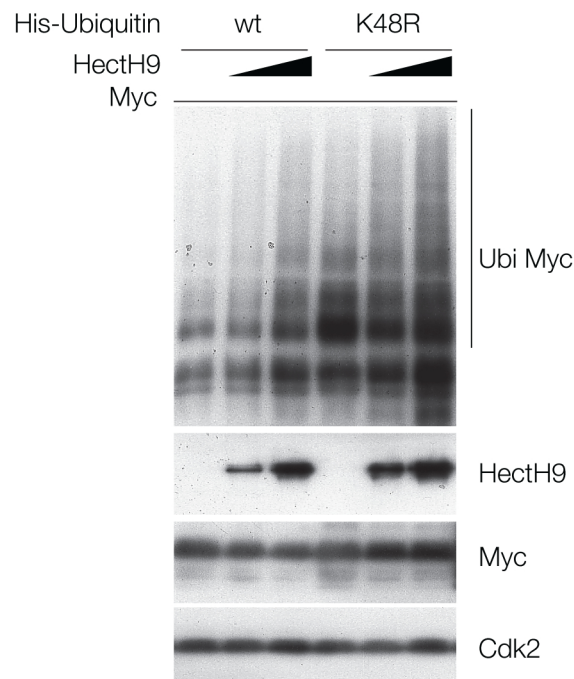
**Abb. 4.1.: Endogene Koimmunpräzipitation von Miz1 und cMyc durch HectH9**

Aus HeLa Zellen wurden Protein Lysate erstellt. Jeweils 1 mg Lysat wurde mit an Protein G-Sepharose gekoppelten anti HectH9- oder Kontrollantikörpern inkubiert, gewaschen, eluiert und im Immunblot analysiert.

## 4.2. HectH9 ubiquitiniert cMyc *in vivo*

HectH9 zeigt Sequenzhomologien mit E3 Ubiquitin Ligasen der HECT Familie. Deshalb wurde untersucht, ob HectH9 Miz1 oder cMyc ubiquitinieren kann. Da HectH9 in voller Länge nur ineffizient überexprimiert werden konnte, wurde HectH9 $\Delta$ N (siehe Material Abschnitt 2.7) für dieses und die weiteren Experimente eingesetzt. Ubiquitinierung von Miz1 durch HectH9 konnte nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Um eine Ubiquitinierung von cMyc nachzuweisen, wurden HeLa Zellen mit cMyc, His markiertem Ubiquitin und ansteigenden Mengen von HectH9 transfiziert. Nach 26 Stunden wurden Lysate erstellt und diese mit Kobalt-Agarose aufgereinigt. Nach drei Waschschritten wurden die Proben eluiert und im Immunblot analysiert (Abbildung 4.2). Wird ein Protein polyubiquitiniert, wird dessen Molekulargewicht erhöht und nicht mehr als einzelne, sondern als nach oben verschobene Banden im Immunblot detektiert. Eine Erhöhung von HectH9 hat eine verstärkte Ubiquitinierung von cMyc zur Folge: Während in Spur 1 von Abbildung 4.2 nur schwache Ubiquitinierung nachgewiesen wird, steigt diese dosisabhängig mit der Erhöhung der HectH9 Menge an (Abbildung

4.2, Spur 2 und 3). Wird eine Ubiquitin Punktmutante eingesetzt, welche nicht mehr über Lysin 48 verknüpft werden kann (Ubiquitin K48R), verhindert dies die Ubiquitinierung nicht (Abbildung 4.2, Spur 5 und 6 im Vergleich zu Spur 4). Dies zeigt, dass HectH9 cMyc ubiquitinieren kann. Diese Polyubiquitinierung von cMyc ist jedoch nicht exklusiv über Lysin 48 verknüpft, da die Mutation von K48 die Ubiquitinierung nicht verhindert.



**Abb. 4.2.: HectH9 ubiquitiniert cMyc *in vivo***

HeLa Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Die Lysate wurden mit Kobalt-Agarose inkubiert, gewaschen, eluiert und im Immunblot analysiert.

### 4.3. Die HectH9 Ziellysine des cMyc Proteins sind konserviert

Durch vorangegangene Experimente konnte die Region des cMyc Proteins, welche durch HectH9 modifiziert wird, eingegrenzt werden. Da Ubiquitin innerhalb eines Proteins nur über Lysine verknüpft werden kann, wurden die sechs in der Zielregion vorkommenden Lysine (K298, K317, K323, K326, K341, K355) in cMyc zu Argininen punktmultiert. Dieses cMyc Konstrukt (Myc KR6) kann nicht mehr von HectH9 ubiquitiniert werden, liegt aber wie wildtyp Myc im Zellkern vor (Doktorarbeit Rudolph Bayer). Um zu überprüfen, ob die von HectH9 modifizierten

Lysine Spezies übergreifend konserviert sind, wurde eine multiple Sequenzanalyse durchgeführt. cMyc Sequenzen verschiedener Spezies wurden mit Hilfe eines ClustalW-Algorithmus auf Basenhomologie hin überprüft. Hierfür wurde die humane Proteinsequenz mit 23 weiteren Myc Orthologen verglichen. Das Ergebnis für die Region um die sechs in der KR6 Mutante veränderten Aminosäuren ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

		298	317	323	326		314	355
sp P01106 MYC_HUMAN	LVL	KRCHVSTHQHNYAAP	-PSTRKDY	--PAAKRV	KLDS	-----	VRVLRQISNNR	KCTSPRSSDTEENVKRRTHNVLER
sp P49709 MYC_CARAU	LVL	KRCHVSTHQHNYAAH	-PSTRHDQ	--PAVKRLR	LETS	-----	SSN	-----RHGKQRKCTSPRTSDSEDNKRRTHNVLER
sp Q90342 MYC2_CYPCA	LVL	KRCHVSTHQHNYAAH	-PSTRHDQ	--PAVKRLR	LESS	-----	SSN	SSNRQKQKCTSPRTSDSEDNKRRTHNVLER
sp P52160 MYC_BRARE	LVL	KRCHVSTHQHNYAAH	-PSTRHDQ	--PAVKRLR	LEASNNHSINSSSSN	-----	SSN	-----RHVKQRKCTSPRTSDSEDNKRRTHNVLER
sp Q90341 MYC1_CYPCA	LVL	KRCHVSTHQHNYAAH	-PSTRHDQ	--PAVKRLR	LEAS	-----	SSNS	-----RHVKQRKCTSPRTSDSEDNKRRTHNVLER
sp P49033 MYC_HYLLA	LVL	KRCHVSTHQHNYAAP	-PSTRKDY	--PAAKRV	KLDS	-----	VRVLRQISNNR	KCTSPRSSDTEENDKRRTHNVLER
sp P49032 MYC_CALJA	LVL	KRCHVSTHQHNYAAP	-PSTRKDY	--PAAKRV	KLDS	-----	VRVLRQISNNR	KCTSPRSSDTEENDKRRTHNVLER
sp Q29031 MYC_PIG	LVL	KRCHVSTHQHNYAAP	-PSTRKDY	--PSAKRA	KLDS	-----	GRVLKQISNNR	KCASPRSSDTEENDKRRTHNVLER
sp Q28566 MYC_SHEEP	LVL	KRCHVSTHQHNYAAP	-PSTRKDY	--PAAKRA	KLDS	-----	GRVLKQISNNR	KCASPRSSDTEENDKRRTHNVLER
sp P06877 MYC_FELCA	LVL	KRCHVPTHQHNYAAP	-PSTRKDY	--PAAKRA	KLDS	-----	GRVLKQISNNR	KCISPRSSDTEENDKRRTHNVLER
sp Q28350 MYC_CANFA	LVL	KRCHVSTHQHNYAAP	-PSTRKDY	--PAAKRA	KLDS	-----	GRVLKQISNNR	KCASPRSSDTEENDKRRTHNVLER
sp P22555 MYC_MARMO	LVL	KRCHVSTHQHNYAAP	-PSTRKDC	--PAAKRA	KLDS	-----	GRVLKQISNNR	KCASPRSSDTEENDKRRTHNVLER
sp P01108 MYC_MOUSE	LVL	KRCHVSTHQHNYAAP	-PSTRKDY	--PAAKRA	KLDS	-----	GRVLKQISNNR	KCSPRSSDTEENDKRRTHNVLER
sp P09416 MYC_RAT	LVL	KRCHVSTHQHNYAAP	-PSTRKDY	--PAAKRA	KLDS	-----	GRVLKQISNNR	KCSPRSSDTEENDKRRTHNVLER
sp P01109 MYC_CHICK	LVL	KRCHVNIHQHNYAAP	-PSTKVEY	--PAAKRL	KLDS	-----	GRVLKQISNNR	KCSPRTSDSEENDKRRTHNVLER
sp P06171 MYC1_XENLA	LVL	KRCHVPIHQHNYAAS	-PSTKVDY	--VSSKRA	KLESN	-----	IRVLKQISNNR	KCASPRSSDSEENDKRRTHNVLER
sp P15171 MYC2_XENLA	LVL	KRCHVPIHQHNYAAS	-PSTKVDY	--VSSKRA	KLESN	-----	VRVLKQISNNR	KCASPRSSDSEENDKRRTHNVLER
sp P26014 MYCN_SERCA	LIL	KRCAPIHQHNYAAPSPFVETEE	-SPPQK	KLK	VEVS	-----	RPVKPTIQPKL	KSSSPRNSDSEDSERRRNHNILER
sp P18444 MYCN_CHICK	LIL	KRCAPIHQHNYAAPSPYMESED	-VPPQK	KLK	AEVP	-----	RPVKPMIQPKS	KSSSPRNSDSEDSERRRNHNILER
sp P04198 MYCN_HUMAN	LIL	KRCLPIHQHNYAAPSPYVESED	-APPOKKI	K	SEASP	-----	RPLKSVIPPKAKS	LSPRNSDSEDSERRRNHNILER
sp Q61976 MYCN_MARMO	LIL	KRCVPIHQHNYAAPSPYVESED	-APPOKKI	K	SEVSP	-----	RPLKSVIPPKAKS	LSPRNSDSEDSERRRNHNILER
sp P03966 MYCN_MOUSE	LIL	KRCVPIHQHNYAAPSPYVESED	-APPOKKI	K	SEASP	-----	RPLKSVVPAKAKS	LSPRNSDSEDSERRRNHNILER
sp Q63379 MYCN_RAT	LIL	KRCVPIHQHNYAAPSPYVESED	-APPOKKI	K	SEASP	-----	RPLKSVVPAKAKS	LSPRNSDSEDSERRRNHNILER
sp P24793 MYCN_XENLA	VIL	KRCAPVHQHNYAAPSPYVETEEVAPPO	K	KL	NELP	-----	RLVKNVVP	TKPKSSSPRNSDSEDSERRRNHNILER

**Abb. 4.3.: Die von HectH9 ubiquitinierten Lysine des cMyc Proteins sind konserviert**

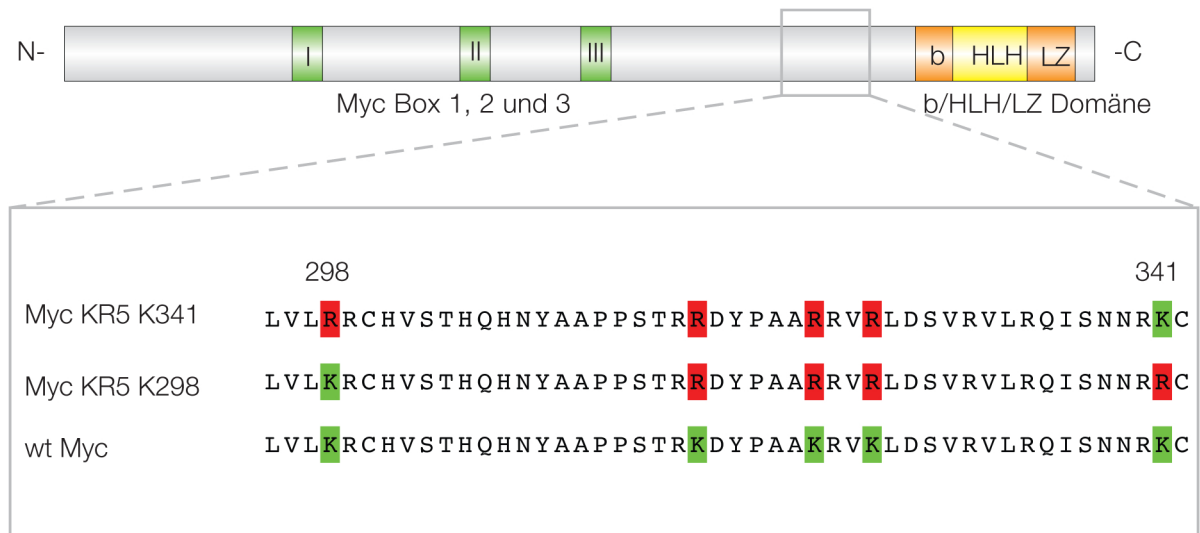
Gezeigt ist ein Ausschnitt einer multiplen Alignment-Analyse verschiedener cMyc -Protein-Sequenzen. Die Sequenzen wurden über die gesamte Länge auf Homologie hin überprüft. Die Lysine, die in mindestens 45% aller Sequenzen vorkommen, wurden grün hinterlegt.

Die Lysine 298, 323 und 341 sind in allen untersuchten cMyc Varianten vorhanden. Auch die anderen Lysine sind in mindestens 45% aller analysierten Sequenzen konserviert. Diese speziesübergreifende Konserviertheit weist auf eine wichtige Funktion dieser Lysine hin.

#### 4.4. Genauere Identifizierung der Ziellysine von HectH9 im cMyc Onkoprotein

Rudolf Beier konnte die von HectH9 ubiquitinierten Lysine im cMyc Onkoprotein auf sechs eingrenzen. Um eine genauere Charakterisierung der Ziellysine vorzunehmen, wurden weitere Punktmutanten von cMyc erstellt. Da Lysin 298, Lysin 323 und Lysin 341 in allen untersuchten cMyc - Spezies konserviert sind (siehe

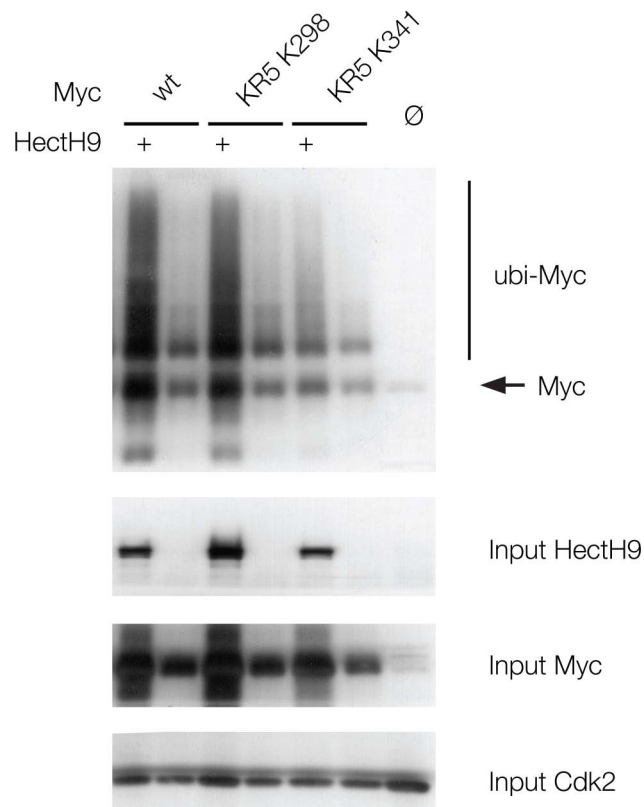
Abbildung 4.3) wurden diese genauer untersucht. Lysin 323 liegt in der NLS Region von cMyc, was eine mögliche HectH9 unabhängige Konservierung erklärt. Um zu überprüfen, ob Lysin 298 und 341 notwendig für die HectH9 abhängige Ubiquitinierung von cMyc sind, wurden diese in Myc KR6 rekonstituiert und dadurch die Mutanten Myc KR5 K298 und Myc KR5 K341 erstellt.



**Abb. 4.4.: Erstellte cMyc Punktmutanten**

Gezeigt sind die erstellten cMyc Mutanten (Myc KR5 K298 und Myc KR5 K341) im Vergleich zu wildtyp Myc und die jeweils in der HectH9 Zielregion mutierten Lysine. Rot: Arginin (mutiert), grün: Lysin (wildtyp)





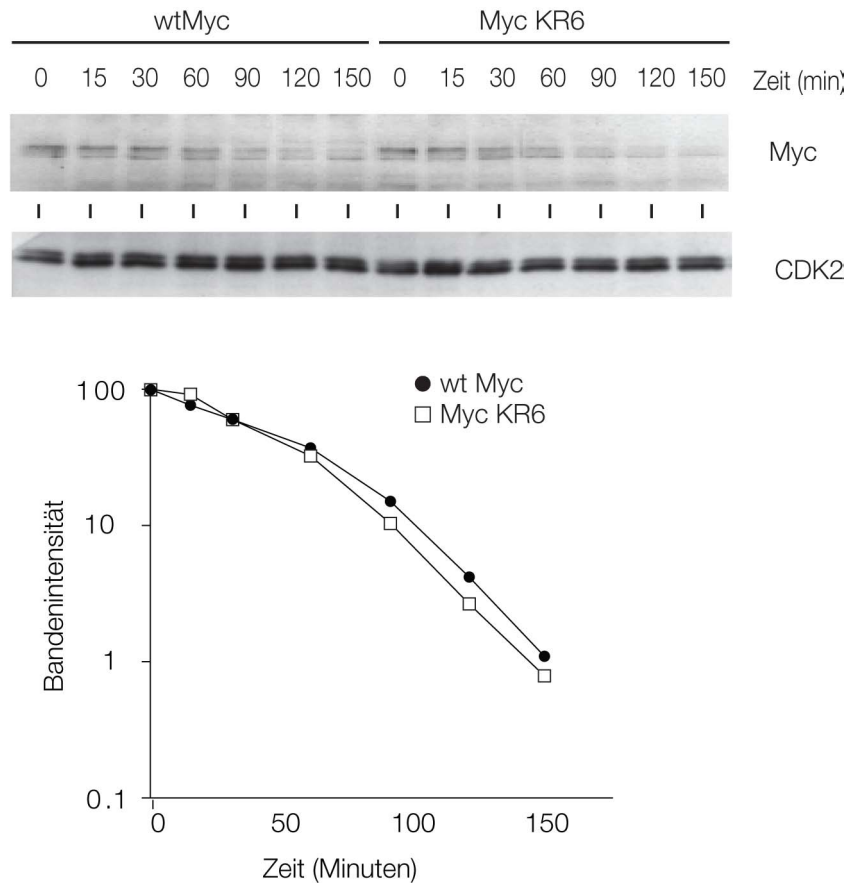
**Abb. 4.5.: cMyc wird von HectH9 an Lysin 298 ubiquitiniert**

HeLa Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Die Lysate wurden mit Kobalt-Agarose inkubiert, gewaschen, eluiert und im Immunblot analysiert.

Diese cMyc Mutanten wurden mit HectH9 und His-Ubiquitin in HeLa Zellen kotransfiziert und mit einem *in vivo* Ubiquitinierungs-Assay analysiert. Myc wird spezifisch von HectH9 ubiquitiniert (Abbildung 4.5, Spur 1). Wird HectH9 nicht kotransfiziert, nimmt die Ubiquitinierung stark ab (Abbildung 4.5, Spur 2). Myc KR5 K298 wird ebenso effizient von HectH9 ubiquitiniert wie wildtyp Myc (Abbildung 4.5, Spur 1, Spur 3). Die HectH9 abhängige Ubiquitinierung von Myc KR5 K341 ist hingegen stark reduziert (Abbildung 4.5, Spur 5). Im Vergleich zu wildtyp Myc wird es trotz Kotransfektion von HectH9 nur unwesentlich ubiquitiniert. Dies bedeutet, dass Lysin 298 ausreichend ist, um eine effiziente Ubiquitinierung von cMyc durch HectH9 zu ermöglichen.

#### **4.5. Die HectH9 abhängige Ubiquitinierung von cMyc beschleunigt dessen Abbau nicht**

HectH9 bindet cMyc als Substrat und ubiquitiniert es (Abbildung 4.1 und 4.2). Dabei erfolgt die Verknüpfung innerhalb der Ubiquitinkette nicht ausschließlich über Lysin 48 (Abbildung 4.2) sondern über Lysin 63 (Doktorarbeit Sovana Adhikary). Degradative Polyubiquitinierung wird in der Regel über Lysin 48 verknüpft. Um zu überprüfen, ob die HectH9 abhängige Ubiquitinierung von cMyc trotzdem ein Degradationssignal ist, wurde ein so genannter Cycloheximid Versuch durchgeführt. NIH 3T3 Zellen wurden mit wildtyp Myc oder Myc KR6 infiziert und selektiert. Nach Zugabe von 50 µg/ml Cycloheximid, einem Proteinsynthese Inhibitor, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Zellen geerntet, lysiert und nach gelelektrophoretischer Auftrennung die cMyc Proteinmengen analysiert (Abbildung 4.6).



**Abb. 4.6.: Wildtyp Myc und Myc KR6 unterscheiden sich nicht in ihrer Abbaugeschwindigkeit**

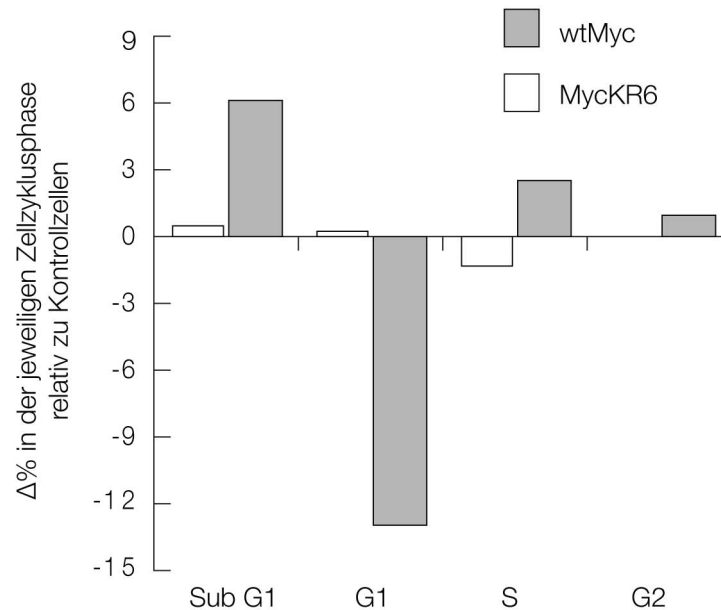
**Oben:** NIH 3T3 Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert. Die Zellen wurden für die angegebene Zeit mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml Cycloheximid inkubiert, geerntet, lysiert und im Immunblot analysiert.

**Unten:** Quantifizierung des Blots, normalisiert auf Cdk2

Wie erwartet nimmt die cMyc Proteinmenge während des Versuchs ab, da Cycloheximid die Neusynthese von Proteinen verhindert, cMyc aber weiterhin proteolytisch abgebaut wird. Wildtyp Myc und Myc KR6 werden mit gleicher Kinetik abgebaut (Abbildung 4.6 unten). Die Abwesenheit der HectH9 Ziellysine hat demnach keinen Einfluss auf die Degradation des cMyc Onkoproteins. Zusammen mit dem Befund, dass es sich nicht um Lysin 48 verknüpfte Ubiquitinierung handelt (Abbildung 4.2), zeigen die Daten, dass HectH9 cMyc nicht degradativ ubiquitiniert, sondern die Modifikation eine andere Funktion hat.

## 4.6. Myc KR6 induziert weder Apoptose noch Zellzyklus Progression

Ubiquitinierung kann neben Proteinabbau auch Proteinaktivität beeinflussen (Einleitung 1.6). In durch Serumreduktion arretierten NIH 3T3 Fibroblasten induziert wildtyp Myc Zellzyklus Progression und Apoptose. Um zu überprüfen, ob die Ubiquitinierung von cMyc durch HectH9 hierbei eine Rolle spielt, wurden NIH 3T3 Zellen mit wildtyp Myc, Myc KR6 oder einem Leervektor infiziert. Nach Selektion wurden die Zellen in 0,1 % Serum für 36 Stunden gehungert und anschließend fixiert, die DNA mit Propidiumiodid angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 4.7). Die Zellzyklusprofile wurden quantifiziert und auf die Leervektor infizierten Zellen normiert. Mit wildtyp Myc infizierte Zellen zeigen im Vergleich zur Kontrolle eine größere Zellpopulation in der S- und G2 Phase, sowie eine Reduktion der Zellen in der G1 Phase. cMyc induzierte Apoptose ist in einer erhöhten Sub G1 Population ebenfalls festzustellen (Abbildung 4.7). Myc KR6 infizierte Zellen unterscheiden sich von wildtyp Myc infizierten Zellen. Sie zeigen weder vermehrt Zellen in S- und G2 Phase noch eine SubG1 Population, sondern verhalten sich vergleichbar zu Kontrollzellen (Abbildung 4.7). Dem zu Folge ist die HectH9 bedingte Ubiquitinierung für die Zellzyklus regulierenden Eigenschaften von cMyc nötig.



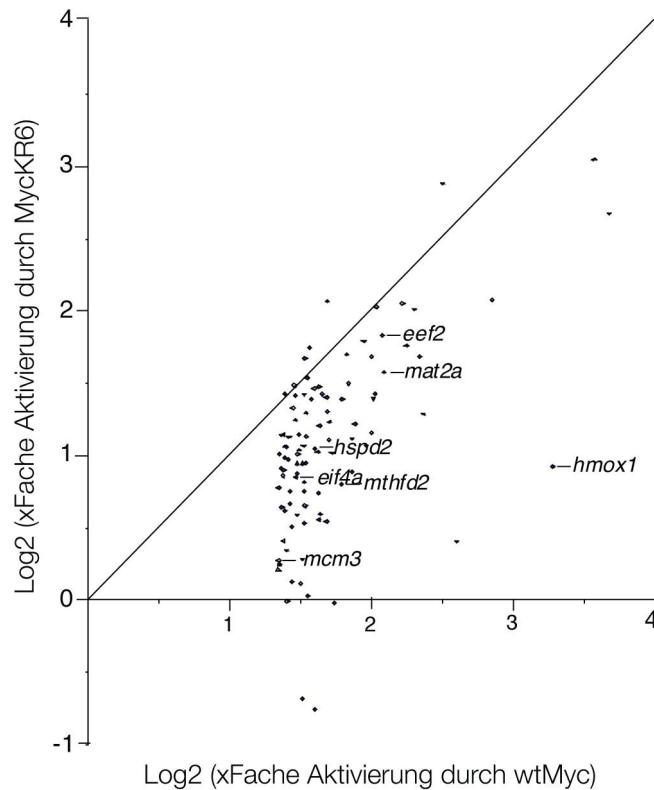
**Abb. 4.7.: wildtyp Myc und Myc KR6 infizierte Zellen unterscheiden sich im Zellzyklus Profil**

NIH 3T3 Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten infiziert, selektioniert, mit 0,1 % FCS Medium gehungert, geerntet und im FACS analysiert. Dargestellt ist der jeweilige Unterschied zu Kontrollzellen. Die hervorgehobenen Gene sind bekannte Myc Zielgene.

#### 4.7. Myc KR6 induziert bekannte cMyc Zielgene nicht mehr

Um die Auswirkung der HectH9 abhängigen Ubiquitinierung von cMyc zu identifizieren, wurden die Genexpressionsmuster von Zellen, die mit wildtyp Myc oder Myc KR6 infiziert wurden, verglichen. NIH-3T3 Zellen wurden mit Retroviren, die entweder für wildtyp Myc, Myc KR6 oder einen Kontrollvektor kodieren, infiziert und selektioniert. Anschließend wurden die Zellen in 0,1 % FCS haltigem Medium gehungert, um die Expression von endogenem cMyc zu verhindern. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und RNA isoliert. Diese wurde mit verschiedenfarbigen Fluorochromen markiert, in cDNA umgeschrieben und jeweils gegen Kontroll-cDNA (Kontrollinfizierte NIH-3T3 Zellen) auf einen 11,5k cDNA „Array“ hybridisiert. Um die „Microarrays“ auszuwerten, wurden zuerst mit Hilfe einer öffentlichen Datenbank ([www.Myccancergene.org](http://www.Myccancergene.org)) Zielgene von cMyc bestimmt. Von diesen waren 510 dem „Array“ vorhanden. Die Aktivierung dieser Gene von wildtyp Myc und Myc KR6 wurde anschließend in Abbildung 4.8 ver-

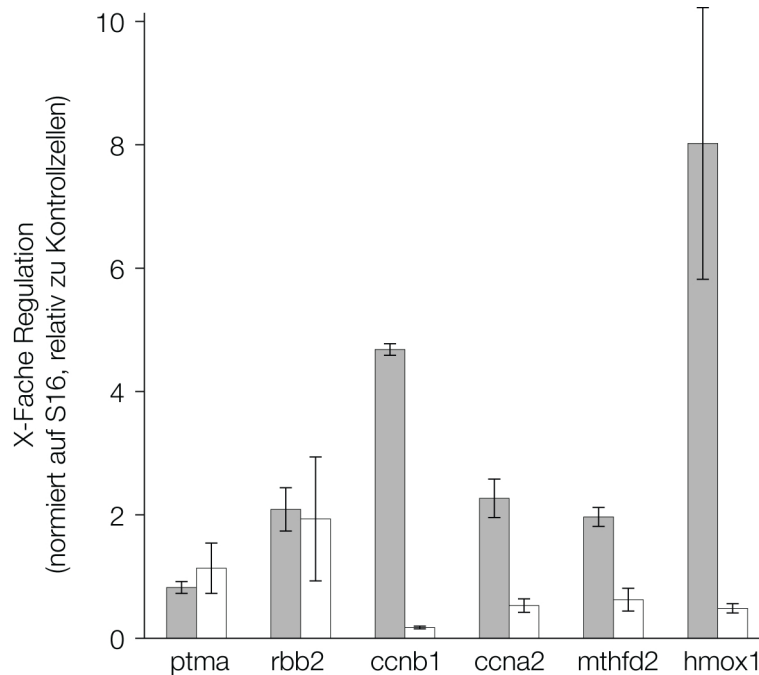
glichen: Gene, die von wildtyp Myc und Myc KR6 in gleichem Maße induziert werden, befinden sich auf der 45° Linie. Viele cMyc Zielgene erscheinen in der Auftragung nach rechts unten verschoben. Das bedeutet, dass diese von Myc KR6 schwächer induziert werden als von wildtyp Myc.



**Abb. 4.8.: Myc KR6 infizierte Zellen induzieren bekannte cMyc Zielgene schwächer als wildtyp Myc**

NIH 3T3 Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten infiziert, selektioniert und mRNA isoliert. Anschließend wurde sie in cDNA umgeschrieben, markiert und auf einen 11,5k „Microarray“ hybridisiert. Gezeigt sind die Expressionsdaten der 100 am stärksten durch wildtyp Myc induzierten Gene auf der X Achse, gegen deren Induktion durch MycKR6, jeweils im Verhältnis zu Kontrollzellen. Die hervorgehobenen Gene sind bekannte Myc Zielgene.

Um auszuschließen, dass es sich hierbei um ein Hybridisierungsartefakt handelt, wurden einige der deregulierten Gene durch eine unabhängige Methode verifiziert (Abbildung 4.9). Hierfür wurde RNA des „Microarray“ Experiments in cDNA umgeschrieben und mit „real-time PCR“ einige der differentiell regulierten Gene überprüft.



**Abb. 4.9.: Myc KR6 infizierte Zellen induzieren bekannte Zielgene schwächer als wildtyp Myc**

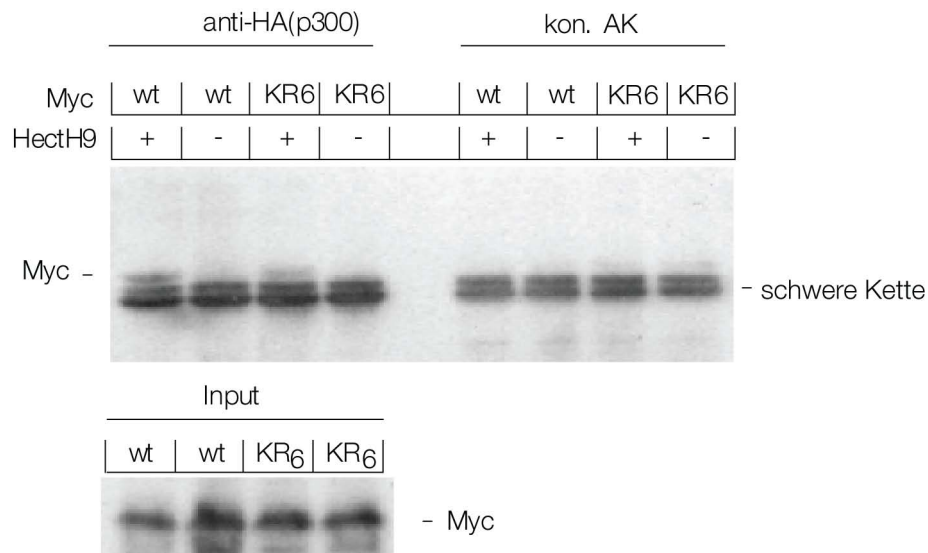
Validierung einiger Zielgene aus Abbildung 4.8 mittels qRT-PCR.

Die Gene *ptma* und *rbb2* werden von beiden cMyc Spezies induziert. *Ccnb1*, *ccna2*, *mthfd2* und *hmox1* werden hingegen nur von wildtyp Myc aktiviert. Myc KR6 zeigt nur eine geringe Induktion der jeweiligen mRNA. Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass Ubiquitinierung von cMyc durch HectH9 die Aktivierung von cMyc Zielgenen beeinflusst. Da die cMyc abhängige Repression von Zielgenen sich im „Microarray“ zwischen wildtyp Myc und Myc KR6 nicht unterscheidet, legt dies nahe, dass die HectH9 abhängige Ubiquitinierung keinen Einfluss auf die cMyc vermittelte Repression hat.

#### 4.8. P300 bindet Myc KR6 schwächer als wildtyp Myc

Myc reguliert Promotoren durch Rekrutierung von aktivierenden Faktoren wie zum Beispiel der Histonacetyltransferase p300. Eine Ursache für die fehlende Transaktivierung von Myc KR6 könnte eine schwächere Rekrutierung von Koaktivatoren auf E-Boxen sein. Mehrere solcher Koaktivatoren wurden beschrieben (Abbildung 1.1). Die meisten binden cMyc aminoterminal und nicht in der Region der Ziellysine von HectH9. P300 hingegen assoziiert in direkter Nachbarschaft dieser in Myc KR6 mutierten Lysine (Vervoorts u. a. (2003)). Deshalb wurde mit-

tels Koimmunpräzipitation untersucht, ob wildtyp Myc p300 HectH9 abhängig bindet. Hierzu wurden Zellen mit p300-HA, einer der beiden cMyc Konstrukte, mit und ohne HectH9 transfiziert. Die Proteinlysate wurden mit Protein-G Sepharose gekoppelten anti HA- oder Kontrollantikörpern immunpräzipitiert und anschließend ein Immunblot gegen cMyc durchgeführt (Abbildung 4.10).



**Abb. 4.10.: Koimmunpräzipitation von cMyc durch p300**

Aus HeLa Zellen wurden mit den jeweiligen Konstrukten transfiziert und Protein Lysate erstellt. 250 µg Lysat wurde mit an Protein G-Sepharose gekoppelten anti p300- oder Kontrollantikörpern inkubiert, gewaschen, eluiert und im Immunblot analysiert.

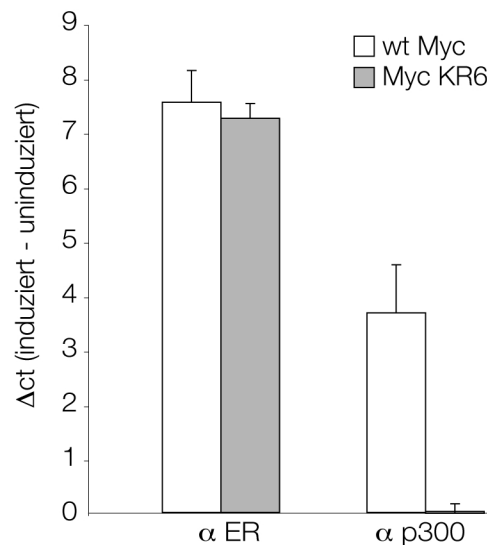
P300 assoziiert nur in Gegenwart von HectH9 an wildtyp Myc (Abbildung 4.10, Spur 1 und 2). Myc KR6 wird im Vergleich zu wildtyp Myc schwächer gebunden (Abbildung 4.10, Spur 1 und 3). Die HectH9 abhängige Ubiquitinierung von cMyc ist dem zu Folge für die effiziente Rekrutierung von p300 notwendig.

#### 4.9. Myc KR6 rekrutiert kein p300 auf den Nukleolin Promotor

cMyc rekrutiert p300 an Promotoren, um diese zu aktivieren. Da Myc KR6 schwächere Affinität zu p300 aufweist wurde mittels Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) überprüft, ob die beiden cMyc Spezies p300 auf den Nukleolin Promotor rekrutieren können. Hierzu wurden Estrogen Fusionskonstrukte (wildtyp Myc-ER und Myc KR6-ER) kloniert. Diese liegen inaktiv an HSP90 gebunden in der Zelle



vor. Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) induziert eine Konformationsänderung des Fusionsproteins, welche die Dissoziation von HSP90 zur Folge hat. Das ungebundene Protein funktioniert nun vergleichbar mit konventionell überexprimierten Konstrukten. NIH-3T3 Zellen wurden mit wildtyp Myc-ER oder Myc KR6-ER infiziert, selektioniert und zusätzlich mit HA markiertem p300 transfiziert. Nach Induktion mit 4-OHT wurden gemischte Zellpopulationen der jeweiligen cMyc Spezies geerntet, fixiert und sonifiziert. Anschließend wurde das Chromatin mit Kontroll-, anti ER- oder anti HA-Antikörpern präzipitiert, gewaschen, eluiert und mittels qRT-PCR analysiert (Abbildung 4.11).



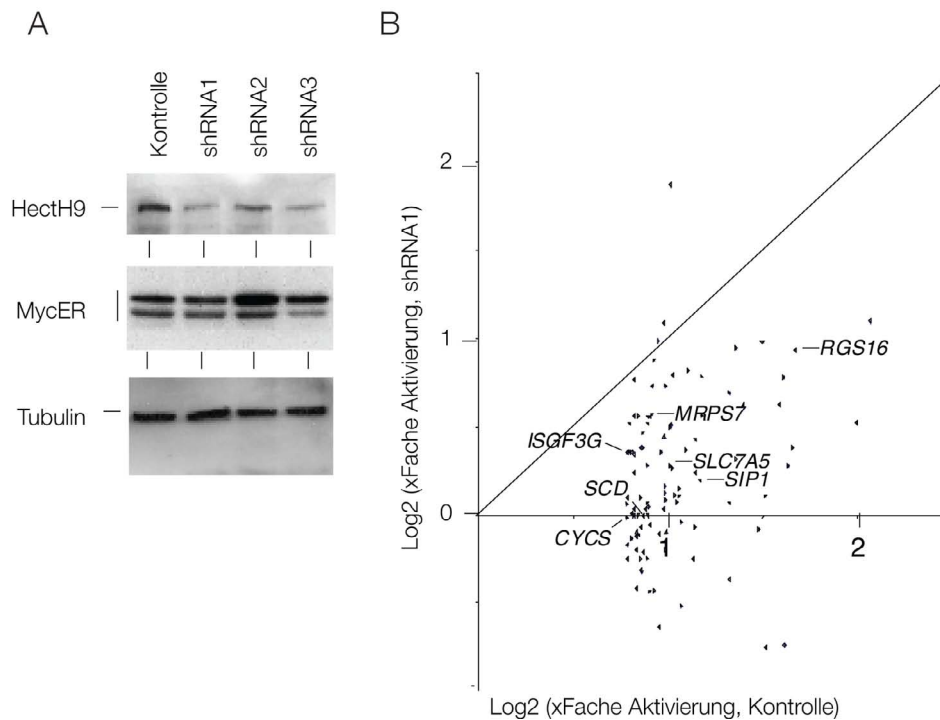
**Abb. 4.11.: Myc KR6-ER rekrutiert nach Induktion kein p300 auf Chromatin**

NIH-3T3 Zellen wurden mit wildtyp Myc-ER und Myc KR6-ER Viren infiziert, selektioniert und mit HA markiertem p300 transfiziert. Anschließend wurden jeweils unbehandelte und mit 4-OHT induzierte Zellpools der jeweiligen cMyc Spezies geerntet und fixiert. Nach Sonifizierung wurde das Chromatin mit Kontroll-, anti ER- oder anti HA-Antikörpern präzipitiert, gewaschen, eluiert und mittels qRT-PCR analysiert.

Nach Induktion durch 4-OHT binden wildtyp Myc und Myc KR6 mit gleicher Effizienz an den Nukleolin Promoter. Während wildtyp Myc p300 nach 4-OHT Behandlung rekrutieren kann, zeigt sich nach Induktion von Myc KR6 keine erhöhte Bindung von p300. HectH9 abhängige Ubiquitinierung ist also für cMyc abhängige effiziente Rekrutierung von p300 auf Nukleolin E-Boxen notwendig.

#### **4.10. HectH9 ist für cMyc abhängige Transaktivierung notwendig**

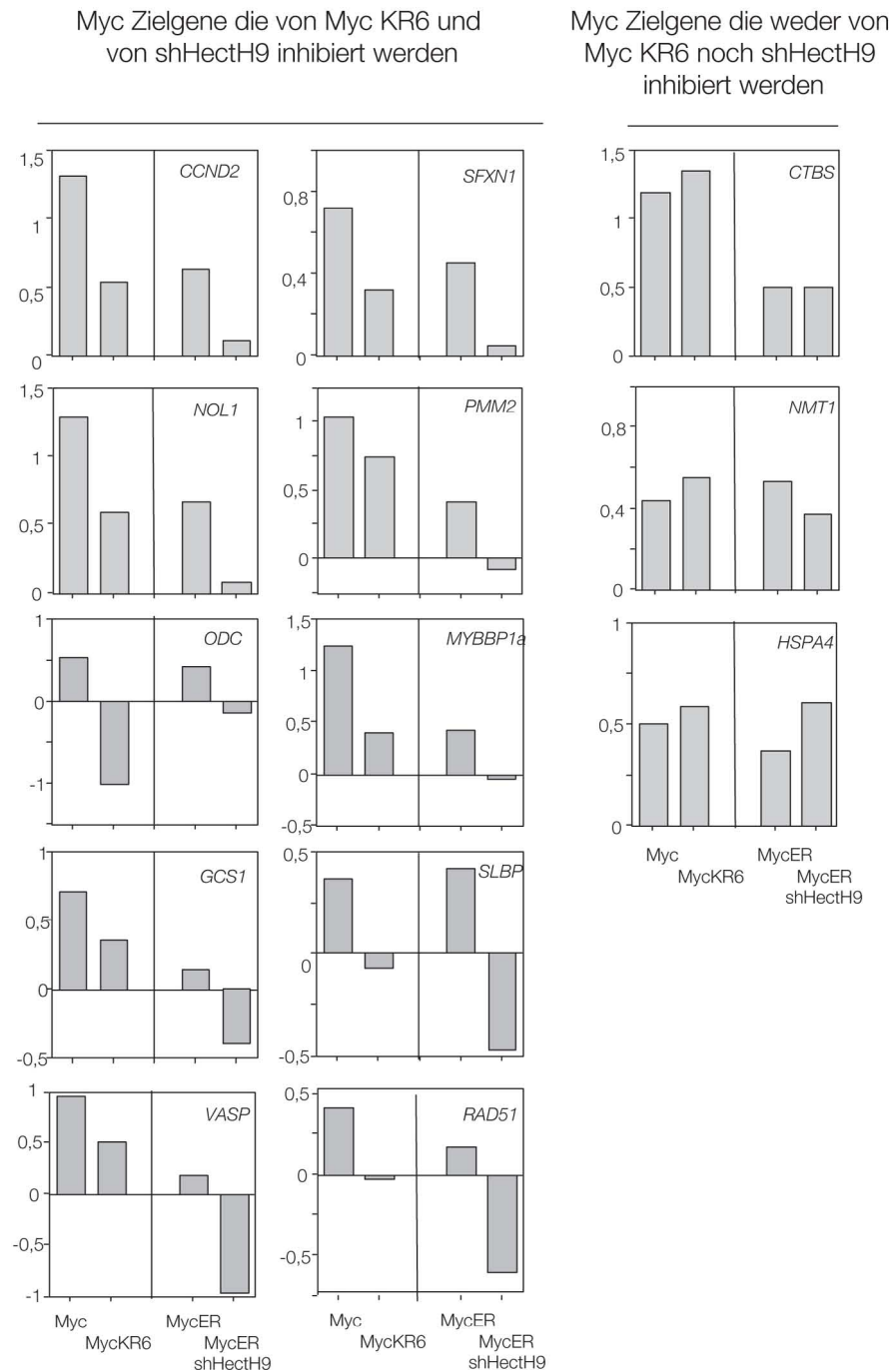
Myc KR6 induziert Zielgene schwächer als wildtyp Myc (Abbildung 4.8). HectH9 kann Myc KR6 nicht mehr ubiquitinieren. Um zu überprüfen, ob die fehlende Ubiquitinierung die Ursache für die Verminderung der Zielgeninduktion ist, wurden U2OS Zellen, die stabil Myc-ER exprimieren, mit HectH9- oder Kontroll-shRNAs infiziert. Die Funktionalität der erstellten shRNAs wurde im Immunblot überprüft (Abbildung 4.12). Für die „Array“ Analyse wurden die Zellen mit shRNA1 infiziert, da diese den effizientesten „knockdown“ erzielte. Nach 36 Stunden wurde durch Zugabe von 4-OHT cMyc induziert. Kontrollzellen wurden mit DM-SO behandelt. Nach weiteren 6 Stunden wurde von allen Zellen RNA isoliert. Proben von cMyc induzierten Zellen wurden mit Cy3, kontrollbehandelte Proben mit Cy5 markiert und auf den selben „Array“ hybridisiert. Nach Auswertung der Daten wurden bekannte cMyc Zielgene nach cMyc Induktion in Kontroll- und HectH9-shRNA Zellen in Abbildung 4.12 gegeneinander aufgetragen. Gene, die durch eine Reduktion von HectH9 nicht beeinflusst werden, befinden sich auf der 45° Linie. Viele cMyc Zielgene erscheinen in der Auftragung nach rechts unten verschoben. Diese werden nach Herabregulation von HectH9 schwächer induziert. Daraus lässt sich folgern, dass HectH9 für die cMyc abhängige Transaktivierung notwendig ist.



**Abb. 4.12.: shHectH9 transfizierte Zellen induzieren bekannte cMyc Zielgene schwächer als Kontrollzellen**

**A:** Analyse der HectH9 Mengen nach Transfektion von verschiedenen HectH9 shRNAs in U2OS Myc-ER Zellen. **B:** „Microarray“ Analyse: U2OS Myc-ER Zellen wurden mit shRNA1 transfiziert, induziert und nach 6 Stunden geerntet und mRNA isoliert. Anschließend wurden die Proben in cDNA umgeschrieben, markiert und auf 11,5k „Microarrays“ hybridisiert. Nach Normierung der induzierten Proben gegen uninduzierte Proben wurden kontrolltransfizierte Zielgene gegen shHectH9 transfizierte Gene aufgetragen. Die hervorgehobenen Gene sind bekannte Myc Zielgene.

Da die Myc KR6 Daten aus Abbildung 4.8 in murinen NIH-3T3 Zellen, die shRNA HectH9 Daten aber aus humanen U2OS stammen, wurden für die jeweilige Auswertung verschiedene, für die Spezies spezifische „Microarrays“ verwendet. Deshalb lassen sich aufgrund von unterschiedlichen Gensets die beiden Ergebnisse nicht komplett vergleichen. Analysiert man aber bekannte Myc-Zielgene, die in beiden Experimenten untersucht wurden, wird eine Übereinstimmung deutlich (Abbildung 4.13). Gene, deren Aktivierung durch die Mutationen in Myc KR6 im Vergleich zu wildtyp Myc nicht mehr effizient transkribiert werden, zeigen auch eine reduzierte Aktivierung nach „knockdown“ von HectH9.



**Abb. 4.13.: Expressionsdaten von cMyc Zielgenen aus beiden „Microarray“ Experimenten**

Vergleich der in den „Microarrays“ gemessenen Expressionswerte von bekannten cMyc Zielgenen. Gezeigt ist die x-fache Induktion der Zielgene relativ zur Kontrolle als natürlicher Logarithmus für das jeweilige Myc Zielgen.

Als weiterer Schwerpunkt wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht ob HectH9 zusammen mit dem Interaktionspartner Miz1 eine Rolle in der DNA Schadensantwort spielt.

#### 4.11. Miz1 überexprimierende Zellen zeigen Anzeichen von DNA Schaden

Es konnte bereits gezeigt werden das Miz1 von der Proteinkinase AKT an Serin 428 phosphoryliert werden kann (Wanzel u. a., 2004). Als Folge dieser Phosphorylierung kann Miz1 nicht mehr an DNA binden. Die Mutante Miz1S428A, die nicht mehr von AKT phosphoryliert wird, bleibt aktiv im Kern. Damit übereinstimmend zeigen LS174T Zellen, in denen Miz1S428A stabil überexprimiert wird erhöhte Mengen von p21, einem Zielgen von Miz1 (Steffi Herold, persönliche Mitteilung). Diese Erhöhung von p21 hat durch die Inaktivierung von Zyklin-CDK2 Komplexen einen verlangsamten Zellzyklus zur Folge. Exponiert man diese Zellen einer niedrigen Dosis UV-B Strahlung, arretieren sie permanent in G1 und G2 Phase, während Kontrollzellen ohne aktives Miz1 nach 24 Stunden wieder eine normale Zellzyklusverteilung aufweisen. Reduktion der endogenen p21 Mengen durch shRNA Mengen retteten diesen Effekt nur partiell (Herold u. a., 2008). Dem zu Folge kann Miz1 den Zellzyklus auch p21 unabhängig arretieren. Es ist bekannt, dass Miz1 mit TopBP1 interagiert (Herold u. a., 2002). TopBP1 aktiviert ATR, ein Schlüsselenzym in der DNA Schaden Reparatur Kaskade. Aktives ATR arretiert Zellen in der S und G2 Phase (Abraham, 2001). Um zu überprüfen, ob Miz1 hierbei eine Rolle spielt, untersuchte Steffi Herold die Proteinmengen von TopBP1 und ATR. Da aktiviertes ATR p53 und Chk1 phosphoryliert, wurden p53, Chk1, phospho-p53 und phospho-Chk1 ebenfalls analysiert.

TopBP1 akkumuliert in LS174T/Miz1S428A Zellen sowohl vor als auch nach UV-B Bestrahlung im Vergleich zu Kontrollzellen. Übereinstimmend hiermit sind ATR Mengen ebenfalls erhöht. Daraus resultiert die stärkere Phosphorylierung von Chk1 und p53. Diese Modifikationen sind sogar in unbestrahlten LS174T/Miz1S428A Zellen zu beobachten.

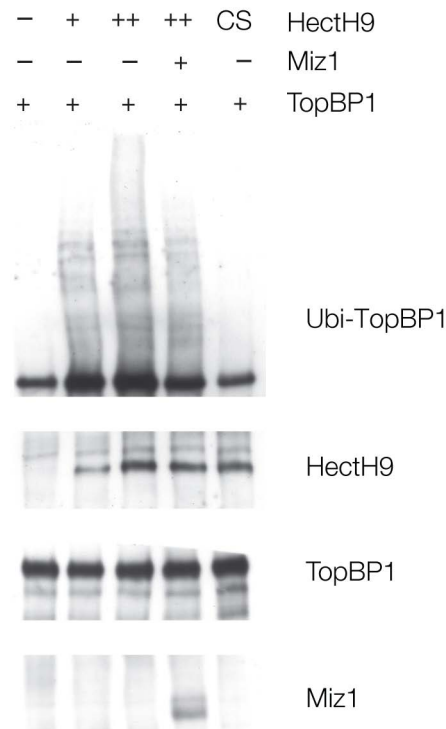
Das heißt, dass Miz1 TopBP1 und ATR beeinflussen kann, um so die DNA Schadensantwort zu modulieren und p21 unabhängig den Zellzyklus arretieren kann. Steffi Herold zeigte ausserdem, dass die Überexpression von Miz1 die Halbwertszeit von TopBP1 und ATR im Cycloheximid Experimenten erhöht. Diese Ergeb-

nisse lassen auf eine E3 Ligase schließen, deren Aktivität durch Miz1 gehemmt wird.

#### 4.12. HectH9 ubiquitiniert TopBP1 *in vivo*

In LS174T Zellen werden ATR und TopBP1 proteolytisch abgebaut. Die Überexpression von Miz1S428A stabilisiert beide Proteine im Cycloheximid Experiment (Steffi Herold, persönliche Mitteilung). Es war bekannt, dass Miz1 an die E3 Ligase HectH9 bindet und diese inaktiviert (Dissertation Sovana Adhikary). Deshalb wurde überprüft, ob HectH9 für den Abbau von TopBP1 verantwortlich ist. Dafür wurden HeLa Zellen mit TopBP1, HectH9, HA-Ubiquitin und mit Miz1 bzw. Kontrollvektor transfiziert. Als Negativkontrolle wurde HectH9CS eingesetzt. Diese HectH9 Mutante ist durch eine Punktmutation katalytisch inaktiv (Adhikary u. a., 2005). 36 Stunden nach Transfektion wurde durch Zugabe von MG132, einem Proteasominhibitor, die Degradation ubiquitiniertes Proteine verhindert. 9 Stunden später wurden die Zellen geerntet, lysiert und mit anti HA-Sepharose inkubiert. Anschließend wurden die an die Sepharose gebundenen Proteine gewaschen, eluiert und nach gelelektrophoretischer Auftrennung die TopBP1 Proteinmengen analysiert (Abbildung 4.14).

Die Koexpression von TopBP1 und HectH9 führt zu einer effizienten Ubiquitinierung von TopBP1. Erhöhung der HectH9 Expression hat eine stärkere Ubiquitinierung zur Folge (Abbildung 4.14, Spur 2 und 3). Diese wird durch Koexpression von Miz1 inhibiert (Abbildung 4.14, Spur 4). Die katalytisch inaktive Mutante HectH9CS induzierte keine Ubiquitinierung von TopBP1 (Abbildung 4.14, Spur 5). Dies lässt auf eine direkte Ubiquitinierung von TopBP1 durch HectH9 schließen. Direkte Ubiquitinierung von ATR durch HectH9 konnte nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die von Steffi Herold gezeigten stabilisierenden Effekte von Miz1 auf ATR sind daher vermutlich nicht direkt.

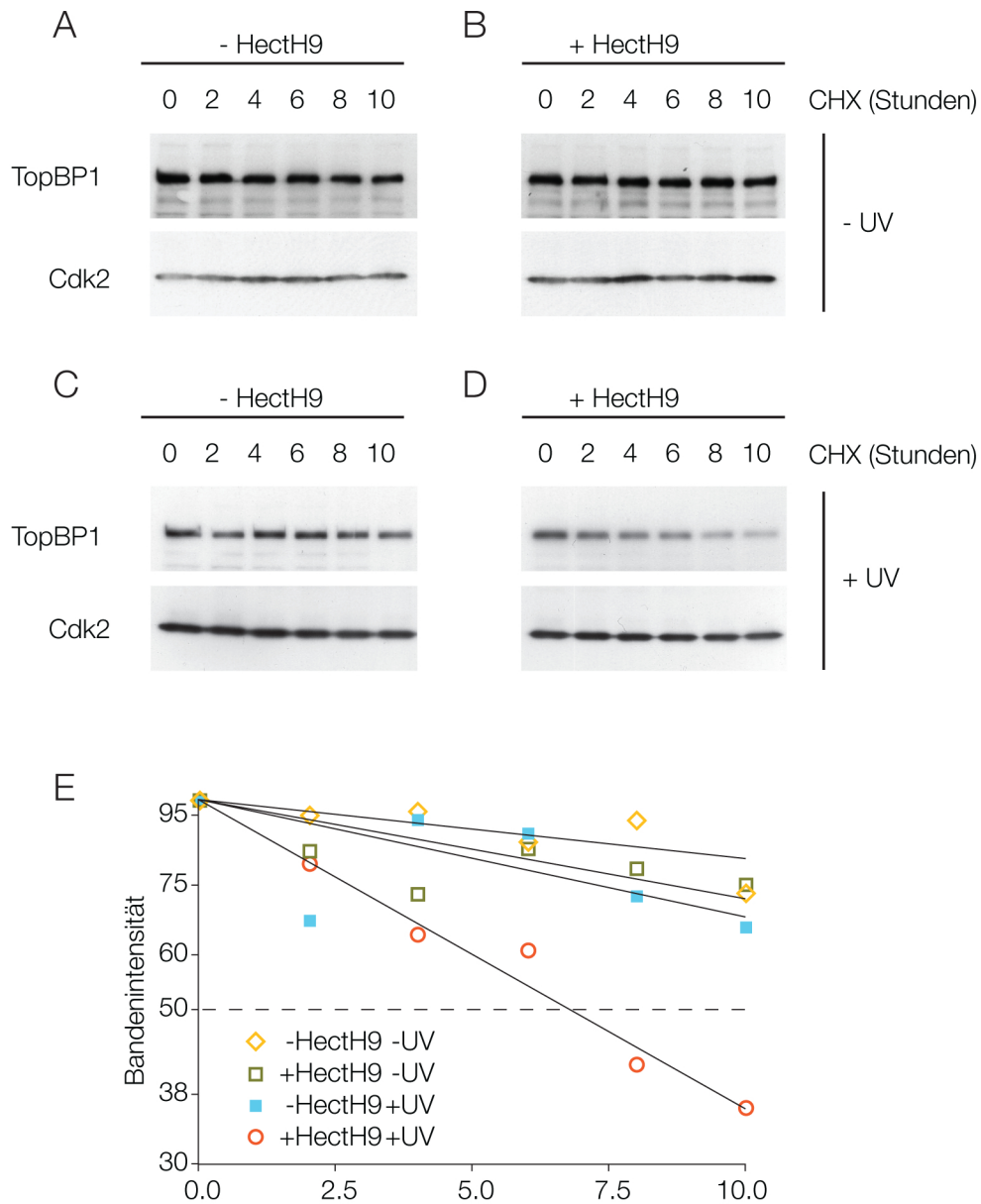


**Abb. 4.14.: HectH9 ubiquitiniert TopBP1 *in vivo***

HeLa Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten und HA-Ubiquitin transfiziert. Die Lysate wurden mit anti HA-Sepharose inkubiert, gewaschen, eluiert und im Immunblot analysiert.

### 4.13. HectH9 degradiert TopBP1 nach UV-Bestrahlung

HectH9 ubiquitiniert TopBP1 *in vivo* (Abbildung 4.14). Um zu überprüfen ob dies eine verstärkte Degradation zur Folge hat und in welchem Kontext der Abbau von TopBP1 durch HectH9 eine Rolle spielt, wurden HectH9 und TopBP1 transient in HeLa Zellen transfiziert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen für 15 Sekunden mit UV-B bestrahlt. Eine Stunde später wurde die Neusynthese von Proteinen durch Zugabe von 100 µg/ml Cycloheximid gehemmt. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, Proteinlysate erstellt und die TopBP1 und Cdk2 Mengen bestimmt (Abbildung 4.15).



**Abb. 4.15.: HectH9 erhöht die Abbaugeschwindigkeit von TopBP1 nach UV-B Bestrahlung**

**A-D:** HeLa Zellen wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. 1 Stunde nach einer 15 sekundigen UV-B Bestrahlung wurden die Zellen mit 100 µg / ml Cycloheximid behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, lysiert und im Immunblot analysiert.

**E:** Quantifizierung von A-D, normalisiert auf Cdk2

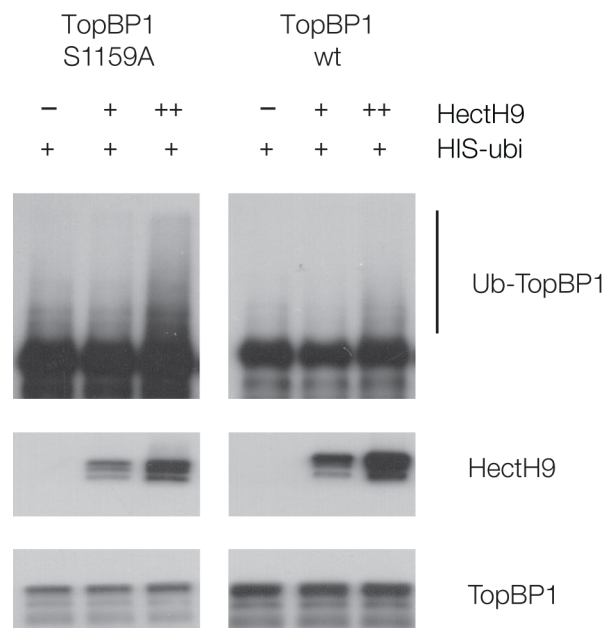
Ohne vorherige Bestrahlung der Zellen wird die TopBP1 Menge über die Zeit kaum reduziert (Abbildung 4.15 A). Koexpression von HectH9 hat hierauf keinen Einfluss (Abbildung 4.15 B). Durch UV Bestrahlung wird die TopBP1 Menge



ebenfalls nur leicht verringert (Abbildung 4.15 C). Im Vergleich hierzu reduziert die Überexpression von HectH9 und anschließende UV-B Exposition die TopBP1 Proteinmenge stark und wesentlich früher (Abbildung 4.15 D). Diese Effekte wurden durch das Programm „imageJ“ quantifiziert und in Abbildung 4.15 E dargestellt. Die Quantifizierung verdeutlicht, dass Überexpression von HectH9 die UV abhängige Degradation von TopBP1 stark erhöht.

#### 4.14. TopBP1 S1159A wird stärker ubiquitiniert

Wie in Abbildung 4.14 gezeigt reduziert die Expression von Miz1 die HectH9 abhängige Ubiquitinierung von TopBP1. Außerdem ist bekannt, dass TopBP1 nach UV-B Bestrahlung schwächer an Miz1 bindet (Herold u. a., 2002). Damit übereinstimmend wird TopBP1 nur nach UV-B Bestrahlung von HectH9 degradiert (Abbildung 4.15). Um den Einfluss von Miz1 auf den Abbau von TopBP1 weiter zu untersuchen, wurde eine TopBP1 Punktmutante (TopBP1 S1159A), die nicht mehr an Miz1 binden kann (Liu u. a., 2006) in einen *in vivo* Ubiquitinierungsexperiment analysiert (Abbildung 4.16).



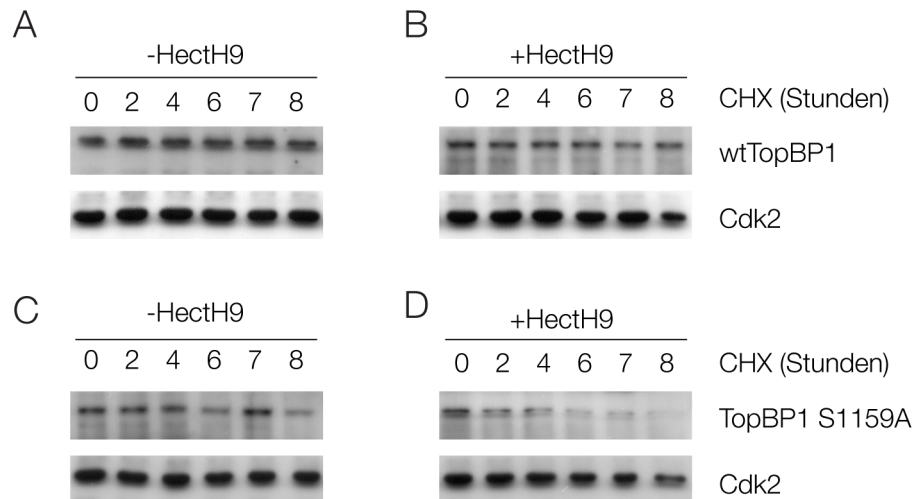
**Abb. 4.16.: HectH9 ubiquitiniert TopBP1 S1159A effizienter als wildtyp TopBP1**

HeLa Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten und His-Ubiquitin transfiziert. Die Lysate wurden mit Kobalt-Agarose inkubiert, gewaschen, eluiert und im Immunblot analysiert.

Dafür wurden HeLa Zellen mit His-Ubiquitin, aufsteigenden Mengen HectH9 und entweder wildtyp TopBP1 oder TopBP1 S1159A transfiziert. Nach 36 Stunden wurden diese für 9 Stunden mit MG132 inkubiert, geerntet und im „Ubiquitinierungs-Assay“ analysiert. Wie in Abbildung 4.16 gezeigt wird, führen zunehmende Mengen von HectH9 zu einer erhöhten Ubiquitinierung von TopBP1 S1159A. Dieser Effekt ist in mit wildtyp TopBP1 transfizierten Zellen wesentlich schwächer ausgeprägt. Das lässt darauf schließen, dass die Bindung von endogenem Miz1 an TopBP1 dessen Ubiquitinierung beeinträchtigt.

#### **4.15. TopBP1 S1159A wird ohne UV induzierten DNA Schaden abgebaut**

TopBP1 wird *in vivo* nur dann von HectH9 degradiert, wenn vorher UV-B Schaden erzeugt wurde (Abbildung 4.15). Da bekannt ist, dass UV-B Strahlung die Bindung von Miz1 an TopBP1 reduziert (Herold u. a., 2002), wurde überprüft, ob TopBP1 S1159A im Cycloheximid Versuch im Gegensatz zu wildtyp TopBP1 auch ohne DNA Schädigung degradiert wird. Da endogenes TopBP1 den Versuch verfälschen könnte wurde FLAG markiertes TopBP1 überexprimiert und detektiert. 36 Stunden nach transienter Transfektion von HectH9 und wildtyp FLAG-TopBP1 oder FLAG-TopBP1 S1159A in HeLa Zellen wurde die Neusynthese von Proteinen durch Cycloheximid Zugabe gehemmt. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, Proteinlysate erstellt und die FLAG-TopBP1 und Cdk2 Mengen bestimmt (Abbildung 4.15).

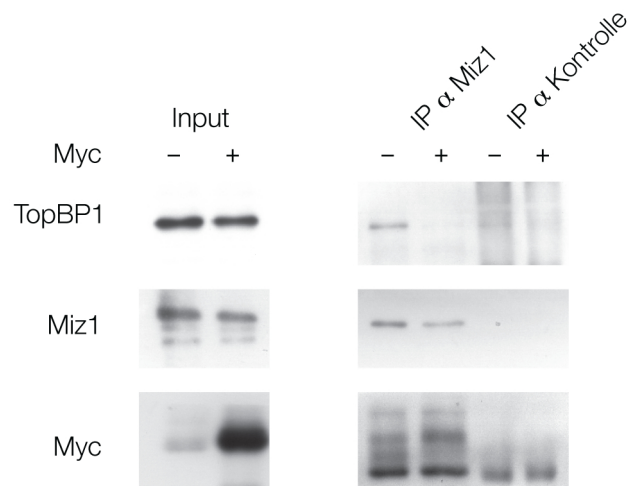


**Abb. 4.17.: HectH9 degradiert TopBP1 S1159A ohne UV Bestrahlung**  
 HeLa Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert mit 100 µg/ml Cycloheximid versetzt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, lysiert und im Immunblot analysiert.

Wildtyp TopBP1 wird über die gesamte Dauer des Experiments nicht signifikant degradiert (Abbildung 4.17 A). Wie in Abbildung 4.15 beeinflusst die Koexpression von HectH9 die wildtyp TopBP1 Menge ohne UV-B Bestrahlung nicht (Abbildung 4.17 B). Im Vergleich dazu nimmt die TopBP1 S1159A Proteinmenge über die Zeit stark ab, wenn HectH9 ebenfalls transfiziert wurde (Abbildung 4.17 D). Die TopBP1 Mutante weist ohne Kotransfektion von HectH9 keine erhöhte Degradation auf (Abbildung 4.17 C). Daraus lässt sich schließen, dass HectH9 TopBP1 nur dann abbauen kann, wenn es nicht an Miz1 gebunden ist.

#### 4.16. cMyc verdrängt TopBP1 von Miz1

Sowohl Miz1 als auch HectH9 interagieren mit cMyc (Abbildung 4.1). Um zu überprüfen, ob cMyc die Affinität von Miz1 zu TopBP1 reduzieren kann wurden Koimmunpräzitationen mit und ohne cMyc Überexpression durchgeführt. In kontrolltransfizierten HeLa Zellen kann in einer Immunpräzitation gegen Miz1 sowohl endogenes cMyc als auch TopBP1 nachgewiesen werden (Abbildung 4.18, Spur 3). Wird cMyc kotransfiziert, ist eine Bindung von Miz1 an TopBP1 nicht mehr nachzuweisen. Nur cMyc ist in der Koimmunpräzitation zu detektieren. cMyc verdrängt dem zu Folge TopBP1 von Miz1.



**Abb. 4.18.: Koimmunpräzipitation von TopBP1 und cMyc durch Miz1**  
 HeLa Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und nach 48 Stunden in NP40 Lysepuffer aufgenommen. Lysat wurde mit an Protein G-Sepharose gekoppelten anti Miz1- oder Kontrollantikörpern inkubiert, gewaschen, eluiert und im Immunblot analysiert.

#### 4.17. Lokalisation von HectH9

HectH9 kann viele zelluläre Prozesse entscheidend beeinflussen. Es erhöht durch Ubiquitinierung cMyc Aktivität (Abbildung 4.2) und beeinflusst Zellzyklus Arrest durch Degradation von TopBP1 (Abbildung 4.14). Des Weiteren wurden Mcl1 und p53 als Substrate von HectH9 beschrieben (Zhong u. a., 2005; Chen u. a., 2005). Um die Regulation dieser Prozesse durch HectH9 besser zu verstehen, wurde die HectH9 Proteinsequenz auf bekannte Regulationsmotive *in silico* analysiert. Hierfür wurde die Proteinsequenz von humanem HectH9 unter Verwendung der Software „Minimotif Miner<sup>14</sup>“ und „Scansite<sup>44</sup>“ mit der Einstellung „hohe Stringenz“ analysiert (Tabelle 4.1). Die Sequenzanalyse durch „Scansite“ identifizierte mehrere ATM/ATR abhängige Phosphorylierungsstellen. Weitere wurden von Matsuoka u. a. (2007) und Mu u. a. (2007) beschrieben. Das HectH9 DNA schadensabhängig modifiziert wird, deutet auf eine Regulation durch DNA Stress hin. Dies liegt nahe, da bereits gezeigt wurde, dass HectH9 TopBP1, ein Schlüsselprotein der DNA Schadensantwort degradieren kann (Abbildung 4.14). Eine Möglichkeit, die Aktivität von Proteinen zu regulieren, ist der spezifische Ex- oder Import in subzelluläre Kompartimente. Die gezielte Kernlokalisierung wird von so genannten NLS („*Nuclear localisation signal*“) und NES („*Nuclear*

*export signal*“) Motiven bestimmt. Die Motivanalyse von HectH9 identifizierte 11 NES und 3 NLS was auf eine regulierte Lokalisation von HectH9 in der Zelle hinweist. Da HectH9 wurde sowohl im Nukleus (Diplomarbeit Andreas Hock; Liu u. a. (2007)) als auch im Zytoplasma nachgewiesen wurde (Doktorarbeit Rudolf Beier; Federica Marioni, persönliche Mitteilung) erscheint diese Art der spezifischen Regulation als wahrscheinlich.

Motiv	Position
NES <sup>1</sup>	89, 97, 132, 305, 581, 604, 799, 800, 806, 1063, 1066, 1532, 1533, 1535, 1554, 1775, 2225, 3172, 3186, 3449, 3844, 4356
NLS <sup>1</sup>	2043, 2692, 3742
ATM/ATR-Ⓟ	S927 <sup>3</sup> , S2377 <sup>2</sup> , S2431 <sup>4</sup> , 3377 <sup>3</sup> , S3584 <sup>4</sup> , S3792 <sup>3</sup> , S3797 <sup>2</sup> , S3816 <sup>4</sup> , T3822 <sup>2</sup>

**Tab. 4.1.: Potentielle regulatorische Motive des HectH9 Proteins**

Die mRNA von HectH9 (AY772009) wurde translatiert und mit Scansite (hohe Stringenz) auf ATM/ATR Phosphorylierungsstellen analysiert. Die NLS/NES Analyse wurde mit „Minimotif Miner“ durchgeführt. Zusätzlich wurden die in Mu u. a. (2007) und Matsuoka u. a. (2007) beschriebenen Phosphorylierungsstellen eingetragen.

<sup>1</sup>„Minimotif Miner“ (<http://sms.engr.uconn.edu/servlet/SMSSearchServlet>)

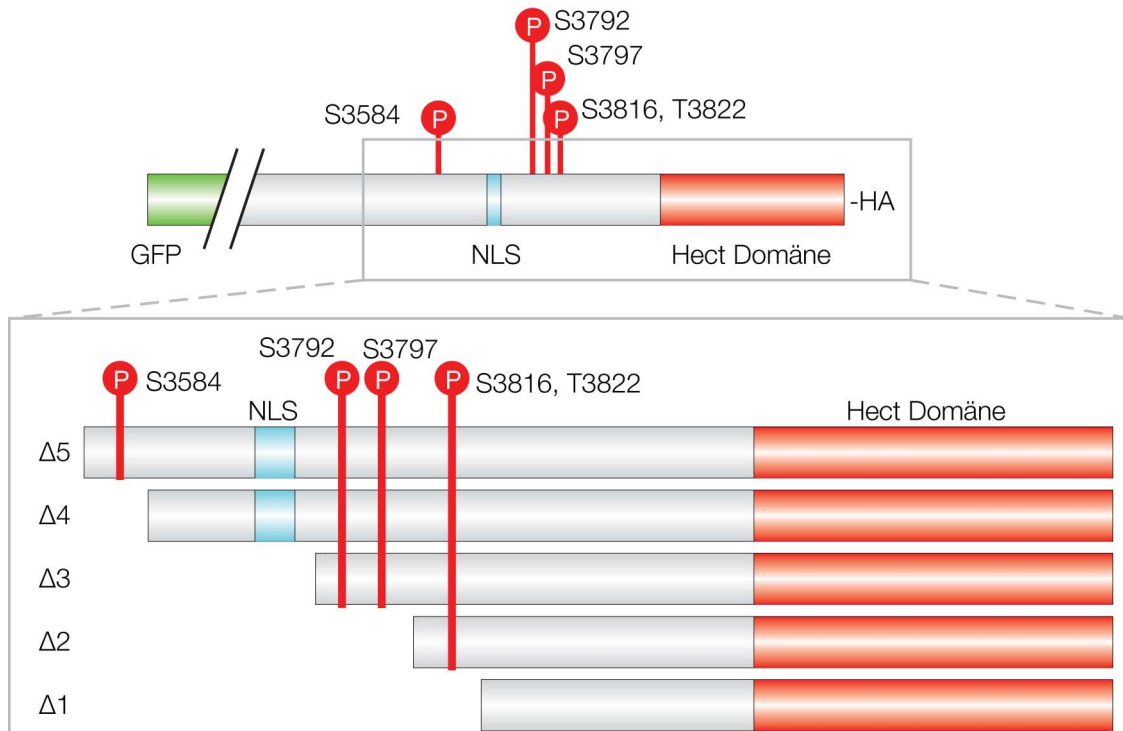
<sup>2</sup>Matsuoka u. a. (2007)

<sup>3</sup>Mu u. a. (2007)

<sup>4</sup>„Scansite“ ([http://Scansite.mit.edu/motifscan\\_seq.phtml](http://Scansite.mit.edu/motifscan_seq.phtml))

## 4.18. Klonierung verschiedener HectH9 GFP Fusionsproteine

Die Sequenzanalyse von HectH9 identifizierte mehrere potentielle ATM/ATR Phosphorylierungsstellen und Lokalisationssignale in HectH9. Außerdem wurde HectH9 in Studien zur Identifikation von ATM/ATR Substraten nachgewiesen (Matsuoka u. a., 2007; Mu u. a., 2007). Um die Lokalisation von HectH9 *in vivo* vor und nach UV Bestrahlung studieren zu können, wurde eine Serie aminoterminaler HectH9 Deletionskonstrukte an GFP fusioniert (Abbildung 4.19). Da diese Fusionsproteine teilweise nicht mehr von den zur Verfügung stehenden HectH9 Antikörpern detektiert werden, wurde ein carboxyterminaler „HA-tag“ eingefügt, um eine zwischen den Mutanten vergleichbare Detektion im Immunblot zu ermöglichen. Die Deletionen wurden so gewählt, das jeweils eine putative Phosphorylierungsstelle oder das carboxyterminale NLS nicht mehr enthalten ist. Vergleiche dieser Konstrukte ermöglichen so einen Rückschluss auf den Einfluss der jeweiligen Motive auf die HectH9 Lokalisation.

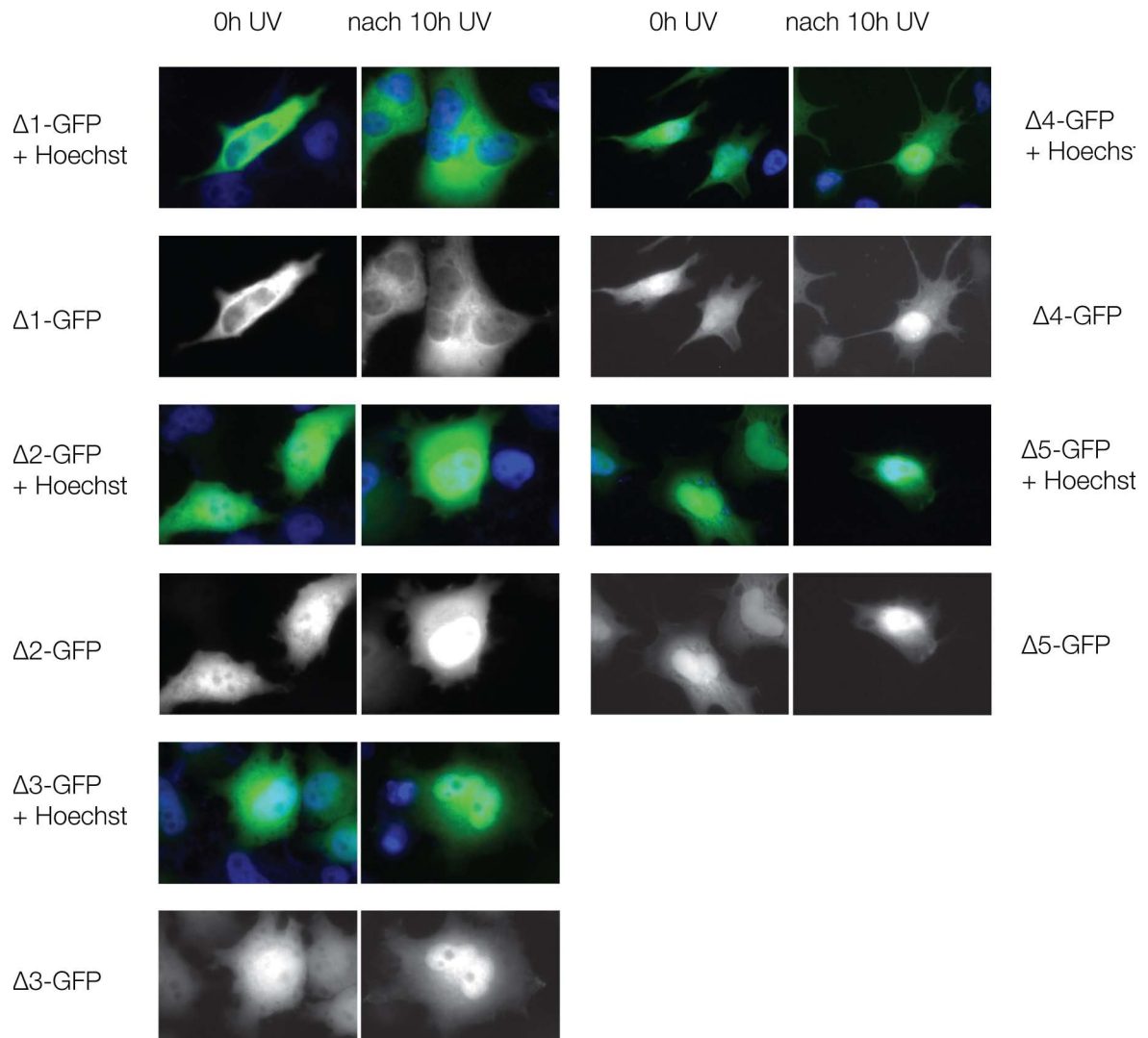


**Abb. 4.19.: Schematische Darstellung der erstellten HectH9 Deletionskonstrukte**

Alle Konstrukte sind im gleichen Leserahmen hinter GFP („Green fluorescent Protein“) fusioniert. Vor das carboxyterminale Stop Kodon von HectH9 wurde ein „HA-tag“ eingefügt, um die Fusionsproteine im Immunblot detektieren zu können.

#### 4.19. Relokalisation von HectH9 durch DNA-Schaden

Um die Lokalisation der erstellten Konstrukte zu überprüfen, wurden HeLa Zellen auf Deckgläsern ausplattiert. Da HectH9 eine Rolle in der DNA Schadensantwort spielt und verschiedene putative DNA schadensabhängige Phosphorylierungsstellen gefunden wurden, wurde 36 Stunden nach Transfektion der Konstrukte ein Teil der Zellen für eine Minute UV-B bestrahlt. Nach weiteren 10 Stunden wurden die Deckgläser mit 4 prozentiger Paraformaldehydlösung fixiert und mikroskopisch analysiert (Abbildung 4.20).



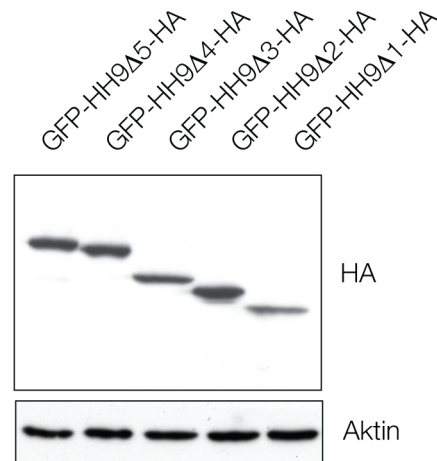
**Abb. 4.20.: Mikroskopische Aufnahme von GFP-HectH9 transfizierten Zellen**

Die verschiedenen Deletionskonstrukte wurden in HeLa Zellen transfiziert, teilweise mit UV-B Licht bestrahlt, fixiert und mit Hoechst 33258 der Zellkern blau angefärbt.

Außerdem wurden Proteinlysate erstellt, um die relative Expression der HectH9 Deletionskonstrukte zu analysieren (Abbildung 4.21). GFP-HectH9 ist in allen Proben in vergleichbaren Mengen detektierbar. Die Konstrukte Δ5 bis Δ2 lokalisieren alle sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus. Nach UV Bestrahlung tritt etwas mehr Fluoreszenz im Nukleus auf. Das Konstrukt Δ1 ist nur im Zytoplasma nachzuweisen. Nach UV Bestrahlung ändert sich dessen Lokalisation nicht. Dies deutet auf eine entscheidende Rolle der Phosphorylierungsstellen S3861 und T3822 hin, da durch ihre Deletion die Relokalisation von HectH9 nach



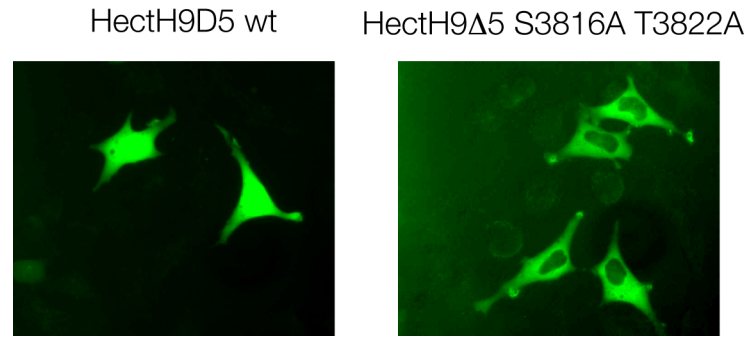
DNA Schaden nicht mehr auftritt. Das NLS scheint für die nukleäre Lokalisation der Fusionsproteine nicht nötig zu sein, da dessen Deletion die Lokalisation von GFP-HectH9 nicht verändert.



**Abb. 4.21.: Expression von GFP-HectH9-HA Deletionskonstrukten**  
Immunblot der in Abbildung 4.20 gezeigten unbehandelten Zellen.

#### 4.20. Lokalisation von HectH9 Punktmutanten

Wie in Abschnitt 4.20 gezeigt, ist HectH9  $\Delta 2$  sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus zu detektieren. Deletiert man weitere 16 AS (HectH9  $\Delta 1$ ), liegt das Konstrukt nur noch zytoplasmatisch vor. Das bedeutet, dass in dieser Region ein entscheidendes Motiv für die subzelluläre Lokalisation liegt. In diesen 16 Aminosäuren befinden sich zwei ATM/ATR Phosphokonsensusmotive. Um zu überprüfen, ob diese für die Relokalisation verantwortlich sind, wurde in HectH9  $\Delta 5$  Serin 3816 und Tyrosin 3822 zu Alanin mutiert. Dieses Konstrukt ist bis auf die putativen Phosphorylierungsstellen homolog zu HectH9  $\Delta 5$ , kann aber an Position 3816 und 3822 nicht mehr phosphoryliert werden, da Alanin keine Phosphogruppen akzeptieren kann. Sowohl HectH9  $\Delta 5$  wildtyp als auch HectH9 SA TA (HectH9  $\Delta 5$  S3816A T3822A) wurden wie in Abschnitt 4.20 beschrieben in HeLa Zellen transfiziert, mit UV-B bestrahlt, anschließend fixiert und die Lokalisation der HectH9 Konstrukte analysiert (Abbildung 4.22).



**Abb. 4.22.: Mikroskopische Aufnahme von GFP-HectH9 transfizierten Zellen**

Die beiden Deletionskonstrukte wurden in HeLa Zellen transfiziert, mit UV-B Licht bestrahlt, fixiert und mikroskopisch analysiert.

Es wird deutlich, dass HectH9  $\Delta 5$  wildtyp nach DNA Schadensinduktion sowohl im Zytoplasma, als auch nukleär vorliegt. Werden Serin 3816 und Tyrosin 3822 zu Alanin mutiert und können dem zu Folge dort nicht mehr modifiziert werden, ist das Protein nur noch im Zytoplasma nachzuweisen. Dies bedeutet, dass die Phosphorylierung von HectH9 am Serin 3816 und oder Tyrosin 3822 eine entscheidende Rolle in der HectH9  $\Delta 5$  Lokalisation spielen.

## 5. Diskussion

### 5.1. Kooperation von HectH9 und cMyc

#### 5.1.1. cMyc wird von HectH9 ubiquitiniert, aber nicht degradiert

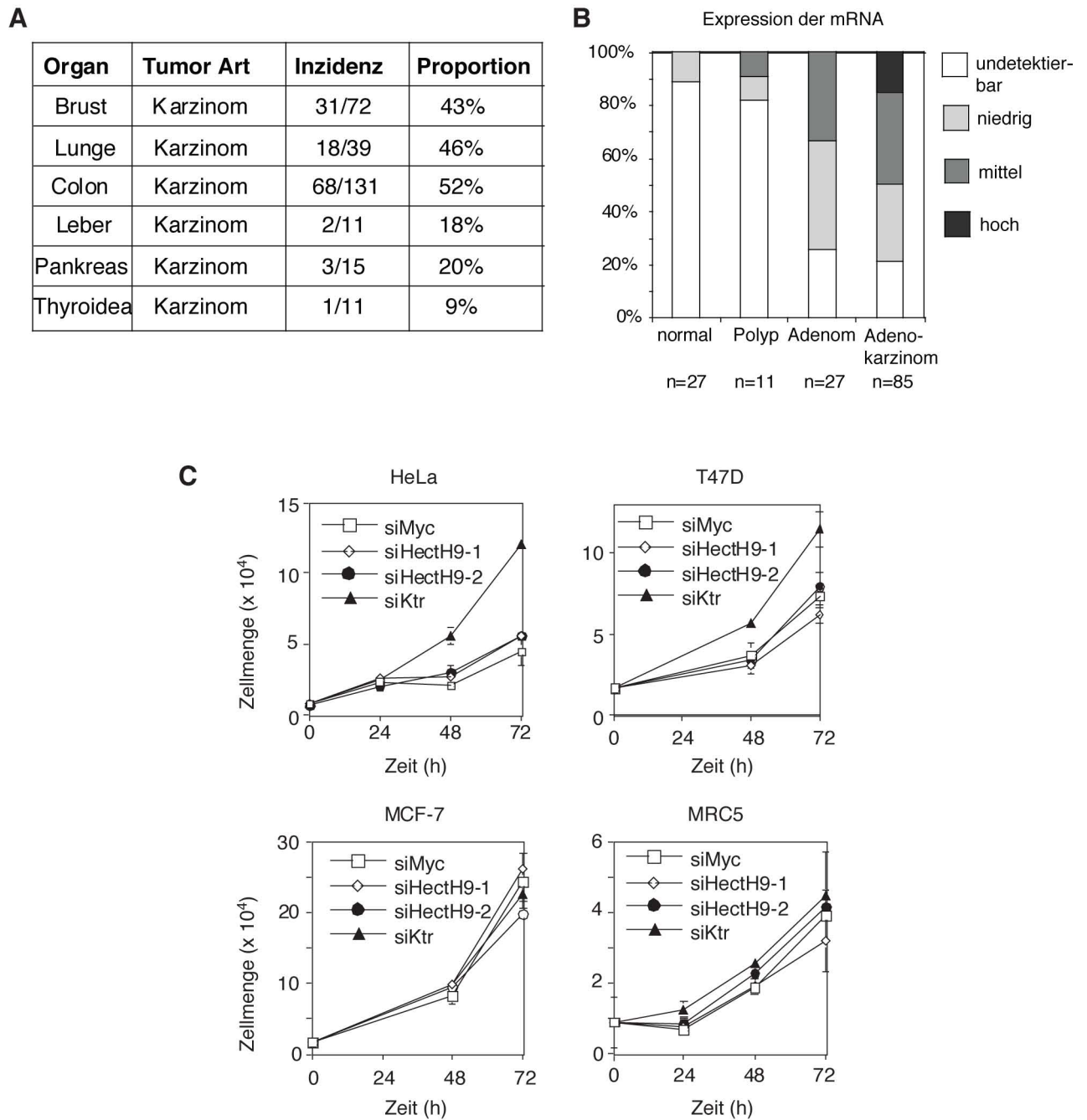
Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass cMyc von den E3 Ligasen Fbw7 und Skp2 ubiquitiniert werden kann. cMyc, welches von Glycogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) an Threonin 58 phosphoryliert wurde (Welcker u. a., 2004; Yada u. a., 2004) wird von Fbw7 erkannt und abgebaut. Mutationen von T58 wirken stabilisierend und wurden in Lymphomen gefunden (Hemann u. a., 2005). Skp2, die zweite Ubiquitinligase bindet cMyc an der „Myc-Box II“ (von der Lehr u. a., 2003), einer konservierten Region im Aminoterminus von cMyc, welche essentiell für die transformierenden Eigenschaften von cMyc ist (Stone u. a., 1987). Ubiquitinierung von cMyc durch Skp2 ermöglicht cMyc vermutlich, den APIS Komplex zu rekrutieren. Dieser aus proteasomalen Untereinheiten bestehende Komplex hat eine degradationsunabhängige, transkriptionell aktivierende Funktion. Skp2 ist für die Transaktivierung von cMyc essentiell (von der Lehr u. a., 2003) und ist deshalb in Tumoren häufig überexprimiert.

Die E3 Ligase HectH9 wurde in einem Hefe-Zwei-Hybrid Versuch als Miz1 assoziiertes Protein gefunden. Sie bindet endogen sowohl Miz1 als auch cMyc (Abbildung 4.1). Eine Modifikation von Miz1 durch HectH9 konnte nicht nachgewiesen werden, cMyc wird jedoch effizient von HectH9 ubiquitiniert (Abbildung 4.2). Diese Ubiquitinierung wird von Miz1 gehemmt (Adhikary u. a., 2005). Sovana Adhikary konnte zeigen, dass die Mutante Myc KR6 nicht mehr von HectH9 ubiquitiniert wird. Um zu überprüfen, ob die Ubiquitinierung von HectH9 die Degradation von cMyc beeinflusst, wurde in einem Cycloheximid Experiment überprüft, ob sich die Abbaugeschwindigkeiten von Myc KR6 und wildtyp cMyc unterscheiden. Die Degradationsgeschwindigkeit von wildtyp Myc und Myc KR6 weisen keinen Unterschied auf (Abbildung 4.6). Dem zu Folge trägt die Ubiquitinierung von cMyc durch HectH9 nicht zur Degradation bei. Abgesehen vom Proteinabbau kann Ubiquitinierung auch die Aktivität von Zielproteinen verändern: Zum Beispiel erhöht die Ubiquitinierung von HIVtat durch Mdm-2 dessen Transaktivierungsaktivität (Bres u. a., 2003). Auch Met4, ein Faktor der bZIP

Familie, welcher Gene der Methioninbiosynthese reguliert, wird bei hohen Mengen von S-Adenosylmethionin durch Ubiquitinierung inaktiviert, aber nicht degradiert (Flick u. a., 2004). Ursache für diese Inaktivierung ist zumindest teilweise eine reduzierte Bindungsfähigkeit von ubiquitiniertem Met4 an Cbf1, einen Koaktivator vom Met4. Neben der relativ gut studierten Polyubiquitinierung über Lysin 48 wurden noch weitere Polyubiquitinketten beschrieben. Lysin 63 Polyubiquitin ist im Gegensatz zu klassischer Lysin 48 Polyubiquitinierung kein degradatives Signal, sondern ist an regulatorischen Prozessen beteiligt: PCNA Ubiquitinierung durch Lysin 63 verknüpfte Ubiquitinketten aktiviert den fehlerfreien Zweig der RAD6-abhängigen DNA Reparatur. PCNA-Monoubiquitinierung scheint dagegen den fehlerbehafteten Zweig RAD6-abhängigen DNA-Reparatur zu aktivieren (Hoege u. a., 2002). Da HectH9 nicht die Stabilität von cMyc beeinflusst, wurde überprüft, welche Art der Polyubiquitinierung HectH9 auf cMyc katalysiert. Es konnte gezeigt werden, dass Ubiquitin auch dann durch HectH9 an cMyc gebunden wird, wenn Lysin 48 mutiert und so eine Polyubiquitinierung über Lysin 48 nicht mehr möglich ist (Abbildung 4.2). HectH9 polyubiquitiniert cMyc dem zu Folge nicht ausschließlich über Lysin 48. Martin Scheffner konnte in *in vitro* Experimenten eine Polyubiquitinierung von cMyc durch HectH9 bestätigen. Er wies mittels massenspektrometrischer Untersuchung über Lysin 6, 11, 48 und 63 verknüpfte Polyubiquitinketten nach (Adhikary u. a., 2005). Experimente von Sovana Adhikary zeigten, dass HectH9 in Zellen cMyc nicht mehr ubiquitiniert, wenn im Ubiquitin Lysin 63 zu Arginin mutiert wurde (Adhikary u. a., 2005). Zusammen genommen bedeutet dies, dass cMyc von HectH9 ubiquitiniert wird; diese Polyubiquitinierung ist *in vivo* nicht ausschließlich über Lysin 48, sondern zumindest zum Teil über Lysin 63 verknüpft, hat keine Verkürzung der Halbwertszeit zur Folge und ist somit kein Degradationssignal. Im Gegensatz dazu beschreiben Zhao u. a. (2008) HectH9 als degradierende E3 Ligase für N- und cMyc. Sie konnten zeigen, dass die Inaktivierung von HectH9 die N-Myc- und in geringerem Umfang auch cMyc Mengen erhöht. Dies hat eine S-Phasen Induktion in primären neuronalen Zellen zur Folge. Überexpression von HectH9 degradiert N-Myc und beschleunigt die Differenzierung von primären neuronalen Zellen. Im Gegensatz dazu konnten Adhikary u. a. (2005) zeigen, dass HectH9 in Tumoren und Tumorzelllinien oft überexprimiert ist. In mehr als 40 % aller untersuchten Brust-Lungen- und Kolonkarzinomen ist die HectH9 Menge im Vergleich zum Ausgangsgewebe erhöht (Abbildung 5.1 A). Im Kolonkarzinom korreliert die Überexpression von HectH9 mit dem Stadium der Krankheit (Abbildung 5.1 B). Während in normalen Darmgewebe HectH9 in nur 10 % aller Proben schwach nachzuweisen

ist, sind in 80 % aller Adenokarzinome die HectH9 Mengen erhöht. Eine Reduktion von HectH9 führt in Tumorzelllinien nicht zu Zellzyklusprogression, sondern zu reduziertem Zellwachstum. Wird HectH9 durch siRNAs depletiert, arretieren sowohl HeLa als auch T47D Zellen (Abbildung 5.1 C). Diese Tumorzelllinien werden durch cMyc siRNA ebenfalls im Wachstum verlangsamt. Ist der Zellzyklus von HectH9 hingegen unbeeinflusst, hat auch Reduktion von cMyc keinen Effekt (Abbildung 5.1 C). Obwohl HectH9 in allen primären Zellen N-Myc degradieren kann (Zhao u. a., 2008), konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit keine Reduktion der cMyc Mengen durch HectH9 festgestellt werden. Weitere Experimente müssen deshalb klären, wie HectH9 Myc Spezies unter verschiedenen Bedingungen ubiquitiniert. Denkbar wäre, dass abhängig von Kofaktoren HectH9 von einem Myc aktivierendem (Ubiquitinierung über K63) zu einem Myc degradierenden Modus (Ubiquitinierung über K48) umschaltet. Dies könnte durch die Kombination von Ubiquitin konjugierendem Enzym (UBC) und HectH9 bestimmt werden. Solch ein Mechanismus wurde für RING und RING artigen U-Box E3 Ligasen beschrieben (Kim u. a., 2007). Hier dienen die E3 Ligasen vor allem der Substraterkennung, während die Ubiquitinierungsreaktion, welche für die Ubiquitiverknüpfung verantwortlich ist zwischen E2 und Zielprotein abläuft. Im Gegensatz dazu sind HECT E3 Ligasen direkt an der Ubiquitinierungsreaktion beteiligt. Es ist unklar, wie HECT E3 Ligasen an der Spezifität der Polyubiquitinkette beteiligt sind. Studien von Rsp5 („Reverses SPT-phenotyp Protein 5“), einer in Hefe exprimierten Ubiquitin E3 Ligase mit HECT Domäne, haben Strukturelemente identifiziert, die für die Art der Ubiquitinkette wichtig sind (Kim u. Huibregtse, 2009). Ob diese Daten auch für andere HECT E3 Ligasen gültig sind, müssen weitere Experimente zeigen.

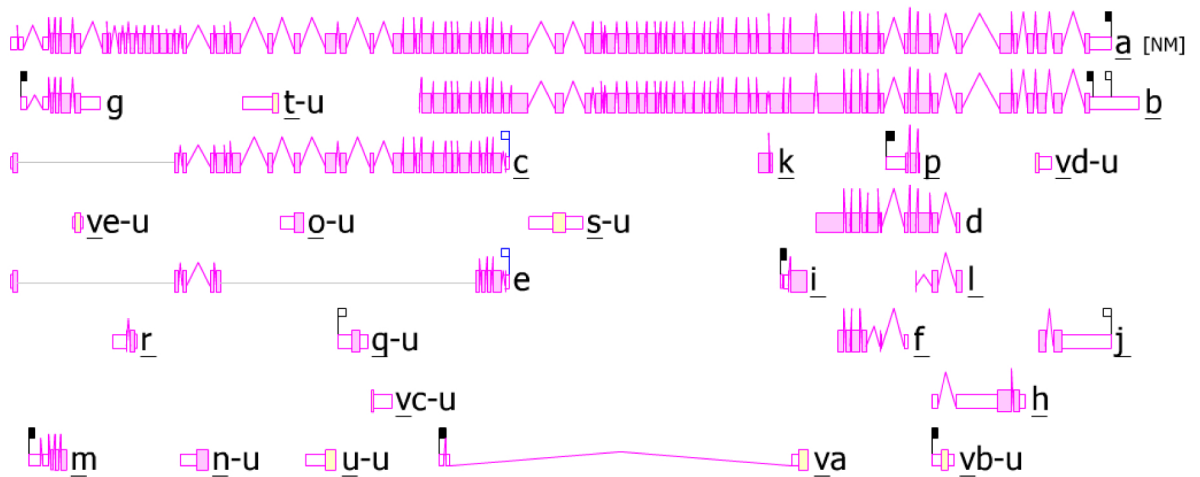
Unterschiedliche HectH9 Varianten durch alternatives „Splicen“ oder alternative mRNA Startpunkte könnten ebenfalls die verschiedenen Aktivitäten von HectH9 erklären. *In silico* Analysen der genomischen Sequenz von HectH9 weisen mehrere alternative Startelemente sowie verschiedene putative „Splicevarianten“ auf (Abbildung 5.2). Auffällig ist hierbei, dass Konstrukt b bis auf 72 Basen dem hier verwendeten HectH9 $\Delta$ N Konstrukt entspricht und für alle konservierten Domänen von HectH9 kodiert. Auch Immunpräzipitationen weisen auf mehrere Isoformen von HectH9 hin: Bei einer Präzipitation gegen HectH9 wird neben dem „full length“ HectH9 (etwa 500kD) mehrere kleinere Fragmente präzipitiert, die durch HectH9 Antikörper spezifisch detektiert werden (Abbildung 5.3). Auch Zhao u. a. (2008) weisen solche möglichen Varianten nach. Diese kürzeren Fragmente haben teilweise eine vergleichbare Größe wie das hier genutzte HectH9 $\Delta$ N und könnten



**Abb. 5.1.: HectH9 ist in Tumoren und Tumorzellen überexprimiert**

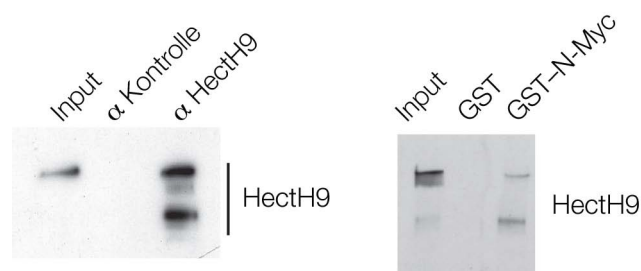
**A, B:** Zusammenfassung eines „Tissue-Microarrays“ aus Adhikary u. a. (2005)

**C:** Die Abhängigkeit der Tumorzelllinien von HectH9 und cMyc; reduziert eine siRNA gegen HectH9 das Zellwachstum, so gilt dies auch für eine siRNA gegen cMyc.



**Abb. 5.2.: Alternative HectH9 mRNAs**

Die genomische Sequenz von HectH9 wurde mittels „AceView“ auf mögliche alternative Transkripte hin untersucht. Gezeigt sind 26 putative alternative Transkripte des Genlokus.



**Abb. 5.3.: Immunpräzipitationen von endogenem HectH9**

**Links:** HEK 293 Zellysate wurden mit HectH9- oder unspezifischen (Maus IgG) Antikörpern präzipitiert und anschließend auf HectH9 hin analysiert. **Rechts:** „GST-pulldown“ aus Zhao u. a. (2008) Rekombinante GST-N-Myc Fusionsproteine wurden mit Lysaten von IMR32 Zellen inkubiert, mit Glutathionsepharose aufgereinigt und anschließend mit Antikörpern gegen HectH9 im Immunblot analysiert.

somit die verschiedenen Ergebnisse erklären. Über die Regulation des HectH9 Genlokus ist bisher nichts bekannt. Weitere Experimente müssen deshalb zeigen, inwieweit verschiedene HectH9 Varianten *in vivo* eine Rolle spielen.

### 5.1.2. Die von HectH9 ubiquitinierten Lysine des cMyc Proteins sind konserviert

cMyc wird von HectH9 an Lysinen zwischen Aminosäure 294 und 376 modifiziert (Adhikary u. a., 2005). Um zu überprüfen, ob die von HectH9 modifizierten

Lysine spezieübergreifend konserviert sind, wurde eine multiple Sequenzanalyse durchgeführt. Myc Sequenzen verschiedener Spezies wurden mit Hilfe eines ClustalW-Algorithmus auf Basenhomologie hin überprüft. Das Ergebnis dieses Vergleichs ist für die Region um die sechs in der KR6-Mutante veränderten Aminosäuren in Abbildung 4.3 dargestellt. Es ist klar zu erkennen, dass obwohl dieser Bereich des cMyc Proteins recht variabel ist, die Lysine einen deutlich höheren Grad an Konserviertheit besitzen als die umliegenden Aminosäuren. Dies deutet darauf hin, dass diese Lysine unter Selektionsdruck stehen, denn sonst wären sie, wie die anderen Aminosäuren der Region ebenfalls, durch zufällige Mutationsergebnisse variiert worden. Da dies nicht der Fall ist, kann angenommen werden, dass die Modifikation von Myc an diesen Lysinen ein genereller, wichtiger Mechanismus ist. Um die Ziellysine von HectH9 weiter einzugrenzen, wurden weitere cMyc Lysin Mutanten erstellt. Während Myc KR5 K298 effizient von HectH9 ubiquitiniert wird, zeigt Myc KR5 K341 eine reduzierte Ubiquitinierung durch HectH9 (Abbildung 4.5). Das heißt, dass HectH9 cMyc primär an Lysin 298 modifiziert. Ob Myc KR5 K298 *in vivo* wildtyp cMyc substituieren kann, werden zukünftige Arbeiten zeigen müssen.

### 5.1.3. Myc KR6 infizierte Zellen arretieren in der G1 Phase des Zellzyklus

cMyc induziert in durch Serumentzug arretierten NIH-3T3 Fibroblasten Zellzyklusprogression und Apoptose. Um zu untersuchen ob die Ubiquitinierung durch HectH9 dies beeinflusst, wurden diese Zellen mit wildtyp Myc oder Myc KR6 infiziert und das Zellzyklusprofil mittels FACS Analyse überprüft. Beide Proben wurden auf Kontrollzellen normalisiert und anschließend miteinander verglichen. cMyc infizierte Zellen arretieren im Vergleich zu Kontrollzellen in geringerem Maße in der G1 Phase und zeigten dagegen vermehrt Zellen in der S- und G2-Phase (Abbildung 4.7). Außerdem wird wie erwartet Apoptose induziert, welches durch eine erhöhte Sub G1 Population deutlich wird. Myc KR6 infizierte Zellen zeigen gegenüber Kontrollzellen weder erhöhte Zellzyklusprogression, noch eine verstärkte Apoptose (Abbildung 4.7). Zusammengenommen macht dieses Experiment deutlich, dass die Ubiquitinierung von cMyc durch HectH9 *in vivo* für die cMyc induzierte Apoptose und Zellzyklusprogression notwendig ist. Auch die Depletion von HectH9 zeigt vergleichbare Ergebnisse: SiRNAs gegen HectH9 arretieren verschiedene Zelllinien (Abbildung 5.1 C), allerdings nur dann, wenn die Reduktion von cMyc ebenfalls einen Effekt auf die Zellteilung hat. Zellen, die cMyc unabhängig wachsen können, werden von HectH9 Depletion ebenfalls nicht beeinflusst. Dies zeigt wiederum, dass HectH9 für cMyc abhängige Funktionen es-



sentiell ist.

Um zu überprüfen, ob die Änderungen in der FACS Analyse auf Unterschiede der cMyc abhängigen Transkription zurückzuführen sind, wurden „Microarray“ Analysen von wildtyp Myc-, Myc KR6- und kontrollinfizierten NIH-3T3 Zellen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass cMyc im Vergleich zu Kontrollzellen Zielgene sowohl aktiviert als auch reprimiert. Myc KR6 hingegen induziert bekannte cMyc Zielgene schwächer. Dies bestätigt, dass die HectH9 vermittelte Ubiquitinierung von cMyc essentiell für die Aktivierung von cMyc Zielgenen ist. Des Weiteren wird hierdurch deutlich, dass die in Myc KR6 eingefügten Mutationen keinen kompletten Funktionsverlust oder Fehllokalisierung zur Folge haben, da Myc KR6 Zielgene vergleichbar zu wildtyp Myc reprimiert. Um die Ergebnisse der „Microarray“ Analysen zu validieren, wurden qRT-PCRs durchgeführt. Alle getesteten cMyc Zielgene die im „Microarray“ differentiell reguliert waren, zeigten auch in der Validierung eine verringerte Induktion durch Myc KR6 (Abbildung 4.9). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass in diesem System die Ubiquitinierung durch HectH9 essentiell für die Transaktivierung von cMyc Zielgenen ist. Sowohl wildtyp Myc als auch Myc KR6 reprimieren Zielgene im gleichen Maße (Abbildung 4.8). Demnach ist die Ubiquitinierung durch HectH9 für die cMyc vermittelte Repression nicht notwendig. Dass die Myc abhängige Transkriptionsaktivierung unabhängig von der Myc vermittelten Genrepression reguliert werden kann wurde bereits von Patel u. McMahon (2006) beschrieben. In dieser Publikation konnte gezeigt werden, dass auch cMyc V394D, eine Punktmutante, die repressionsdefizient ist (Herold u. a., 2002), weiterhin Zielgene vergleichbar zu wildtyp Myc aktiviert und so Zellzyklusprogression induzieren kann.

Die Auswirkungen der HectH9 vermittelten Ubiquitinierung wurden bis jetzt nur indirekt durch die Verwendung von Myc KR6 im Vergleich zu wildtyp Myc untersucht. Um zu überprüfen, ob die Transaktivierungsdefizienz von Myc KR6 ausschließlich auf die reduzierte Ubiquitinierung durch HectH9 zurückzuführen ist, wurden U2OS Zellen, die Myc-ER stabil exprimieren, mit Kontroll- oder HectH9 shRNAs infiziert, gehungert und die RNA in einem Microarray Experiment analysiert. Myc-ER induziert nach Zugabe von 4-OHT Zielgene. Nach Reduktion von HectH9 durch shRNA fällt diese Induktion deutlich schwächer aus (Abbildung 4.12). Ubiquitinierung von cMyc durch HectH9 ist also essentiell für die Aktivierung einer Gruppe von Zielgenen. Auch in diesem Experiment werden cMyc reprimierte Gene von HectH9 Reduktion nicht beeinflusst.

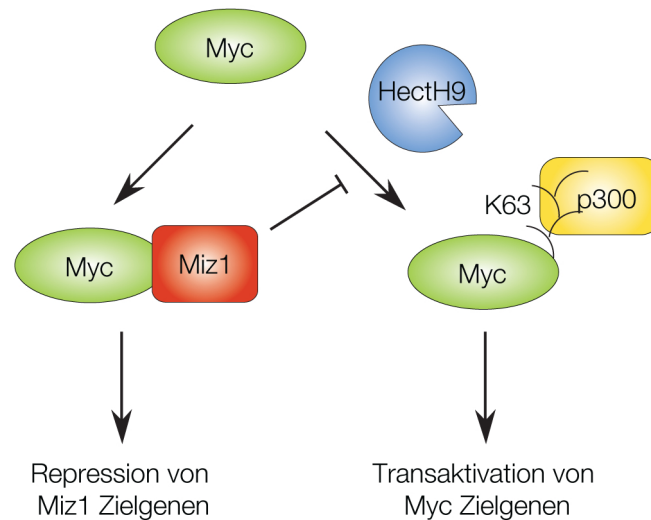
#### 5.1.4. Das cMyc Miz1 HectH9 Netzwerk

Ein Ziel dieser Doktorarbeit war es, die Zusammensetzung des cMyc-Miz1-HectH9-Komplexes zu analysieren. Rudolf Beier konnte zeigen, dass HectH9 sowohl mit cMyc als auch mit Miz1 interagiert, wenn die Proteine in HeLa-Zellen überexprimiert werden. Um zu testen, ob diese Interaktion auch in untransfizierten Zellen nachweisbar ist, wurden in HeLa-Zellen endogene Koimmunpräzipitationen gegen HectH9 durchgeführt. Nach der Präzipitation von HectH9 durchgeführte Immunblots zeigen, dass HectH9 endogen sowohl mit cMyc als auch mit Miz1 interagiert (Abbildung 4.1). Die Interaktion von HectH9 und cMyc wurde von Koch u. a. (2007) bestätigt.

Myc transaktiviert Zielgene durch die Rekrutierung von Kofaktoren wie dem Mediator Komplex und der Histonacetyltransferase p300 (Abbildung 1.3). Da Ubiquitinierung durch HectH9 für die Transaktivierung von cMyc Zielgenen wichtig ist, wurde untersucht, ob diese bekannte Kofaktoren von cMyc beeinflusst. Vervoorts u. a. (2003) konnten zeigen, dass p300 cMyc in der HectH9 Zielregion bindet. Deshalb wurde überprüft, ob die Ubiquitinierung von cMyc durch HectH9 die Affinität zu p300 verändert. Wildtyp Myc wird nur dann von p300 gebunden, wenn auch HectH9 kotransfiziert wurde. Ohne HectH9 findet diese Interaktion nicht statt (Abbildung 4.10). Myc KR6 bindet p300 trotz Koexpression von HectH9 nur schwach (Abbildung 4.10). HectH9 ist dem zu Folge für eine effiziente Assoziation von p300 an cMyc notwendig. P300 verstärkt die Transkription durch Acetylierung von Histonen (Bannister u. Kouzarides, 1996). HectH9 ist zwar nukleär (Diplomarbeit Andreas Hock), aber nicht Chromatin assoziiert (Steffi Herold, persönliche Mitteilung). cMyc wird von HectH9 ubiquitiniert und rekrutiert anschließend p300 auf Promotoren. Myc KR6 wird nicht mehr von HectH9 ubiquitiniert. Deshalb sollte es auch weniger p300 zu cMyc Zielgenpromotoren rekrutieren. Dies konnte in einem Chromatin-Immünpräzipitation Experiment bestätigt werden (Abbildung 4.11): Nach Induktion mit 4-OHT binden sowohl wildtyp Myc-ER als auch Myc KR6-ER vergleichbar an den Nukleolin Promotor. P300 wird jedoch nur durch wildtyp Myc auf den Promotor rekrutiert. Nach Induktion von Myc KR6 ist keine Assoziation von p300 nachweisbar. Die Ubiquitinierung von cMyc durch HectH9 dient dem zu Folge als Erkennungsmotiv für p300; wird die Ubiquitinierung durch Punktmutationen verhindert, ist kein p300 auf dem Nukleolin Promotor nachzuweisen. Das heißt nicht, dass die Rekrutierung von p300 der einzige Grund für die reduzierte Transaktivierung von Myc KR6 ist. Depletionsexperimente von HectH9 mittels shRNA könnten hier-

über genaueren Aufschluss geben.

Zusammengenommen kann man anhand dieser Daten folgendes Modell erstellen: cMyc und Max liegen im Zellkern als Komplex vor. Nach Ubiquitinierung von cMyc durch HectH9 rekrutiert cMyc p300 an cMyc aktivierte Zielgene und wirkt so als Transaktivator. Wird cMyc hingegen von einem noch unbekanntem Ubiquitin abspaltenden Enzym (DUB) deubiquitiniert, kann Miz1 binden und so erneute Ubiquitinierung von cMyc durch HectH9 verhindern (Abbildung 5.4).



**Abb. 5.4.: Model des cMyc Miz1 HectH9 Netzwerks**

HectH9 kann cMyc mit Lysin 63 verknüpften Polyubiquitinketten modifizieren. Dies wird von p300 erkannt und führt zur Aktivierung von Myc Zielgenen. Diese Ubiquitinierung wird von Miz1 gehemmt; so kann cMyc Miz1 abhängige Gentranskription inhibieren.

## 5.2. HectH9 und TopBP1

### 5.2.1. TopBP1 wird von HectH9 ubiquitiniert

Es war bekannt, dass TopBP1 mit Miz1 interagiert (Herold u. a., 2002; Liu u. a., 2006). Steffi Herold konnte zeigen, dass diese Interaktion TopBP1 an Chromatin rekrutiert. Nach UV-B Bestrahlung wird dieser Komplex gelöst und TopBP1 wird zu DNA Strangbrüchen rekrutiert wo es zusammen mit anderen Faktoren den Zellzyklus arretieren kann (Abbildung 1.7). Überexpression von Miz1 hat eine Stabilisierung von TopBP1, Phospho-Chk1 und Phospho-p53, mit und ohne UV-B Bestrahlung zur Folge (Herold u. a., 2008). Reduktion von Miz1 durch siRNA vermindert die TopBP1, ATR, phospho-Chk1, phospho-p53 und p53 Mengen. Ohne Miz1 wurden diese Proteine auch nach UV-B Bestrahlung nicht mehr stabilisiert. Die mRNAs dieser „Checkpoint“ Faktoren bleiben bis auf p53 unverändert, was auf eine Regulation auf Proteinebene hinweist. Um die Stabilisierung von TopBP1 durch Miz1 besser zu verstehen, wurden Fraktionierungsexperimente durchgeführt. Steffi Herold konnte zeigen, dass TopBP1 in Ls174T Zellen chromatingebunden vorliegt (Herold u. a., 2008). Zugabe von MG132 zu Miz1 depletierten Zellen erhöhte die TopBP1 Mengen in der löslichen, Chromatin ungebundenen Fraktion der Zelle. Miz1 ist dem zu Folge für Rekrutierung und Stabilisation von TopBP1 nötig. Wird es depletiert, löst sich TopBP1 vom Chromatin und wird proteasomal abgebaut. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Miz1 HectH9 inhibieren kann Adhikary u. a. (2005). Um zu testen, ob HectH9 neben cMyc auch ATR und TopBP1 als Substrat erkennt, wurden für beide Ubiquitinierungsexperimente durchgeführt. Eine Aktivität von HectH9 auf ATR konnte nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt). TopBP1 hingegen wird spezifisch ubiquitiniert (Abbildung 4.14). Die Kotransfektion von Miz1 blockiert die enzymatische Aktivität von HectH9. HectH9 CS, eine katalytisch inaktive Mutante erhöht die Ubiquitinierung von TopBP1 nicht. Dies bedeutet dass HectH9 TopBP1 ubiquitiniert und dadurch die DNA Schadens Antwort direkt beeinflussen kann. Reduziert HectH9 die TopBP1 Mengen, kann TopBP1 nicht mehr in vollem Umfang ATR aktivieren und so die Zelle nicht effizient arretieren.

### 5.2.2. HectH9 degradiert TopBP1 nach UV-B induzierten DNA Schaden

HectH9 ubiquitiniert TopBP1 (Abbildung 4.14). Um zu überprüfen, unter welchen physiologischen Bedingungen der Abbau von TopBP1 durch HectH9 eine Rolle spielt, wurde die TopBP1 Stabilität in einem Cycloheximid Experiment untersucht. TopBP1 ist über die gesamte Dauer des Versuchs stabil (Abbildung

4.15). Koexpression von HectH9 hat hierauf keinen Einfluss, vermutlich da Miz1 TopBP1 bindet und so vor Degradation schützt. UV-B Bestrahlung löst die Bindung von TopBP1 und Miz1 (Herold u. a., 2002). Nach DNA Schadensinduktion wird TopBP1 bei Koexpression von HectH9 schneller abgebaut (Abbildung 4.15). Damit übereinstimmend wird TopBP1 S1159A, eine Punktmutante, die nicht mehr Miz1 bindet auch ohne UV-B Bestrahlung von HectH9 stärker ubiquitiniert (Abbildung 4.16) und degradiert (Abbildung 4.17). Daraus lässt sich schließen, dass HectH9 TopBP1 nur dann zur Degradation markieren kann wenn es nicht an Miz1 gebunden ist. Dies konnte durch „Knockdown“ Experimente bestätigt werden: Depletion von Miz1 in LS147T Zellen hat eine Reduktion von TopBP1, ATR, phospho-Chk1, phospho-p53 und p53 zur Folge (Herold u. a., 2008). HectH9 ist also für die Degradation von TopBP1 und indirekt für den Verlust der anderen „Checkpoint“ Proteine verantwortlich: Wird neben Miz1 zusätzlich HectH9 depletiert, steigen die Mengen von TopBP1, ATR, phospho-Chk1, phospho-p53 und p53 wieder an. HectH9 ist also auch im endogenen System für die Degradation von TopBP1 verantwortlich.

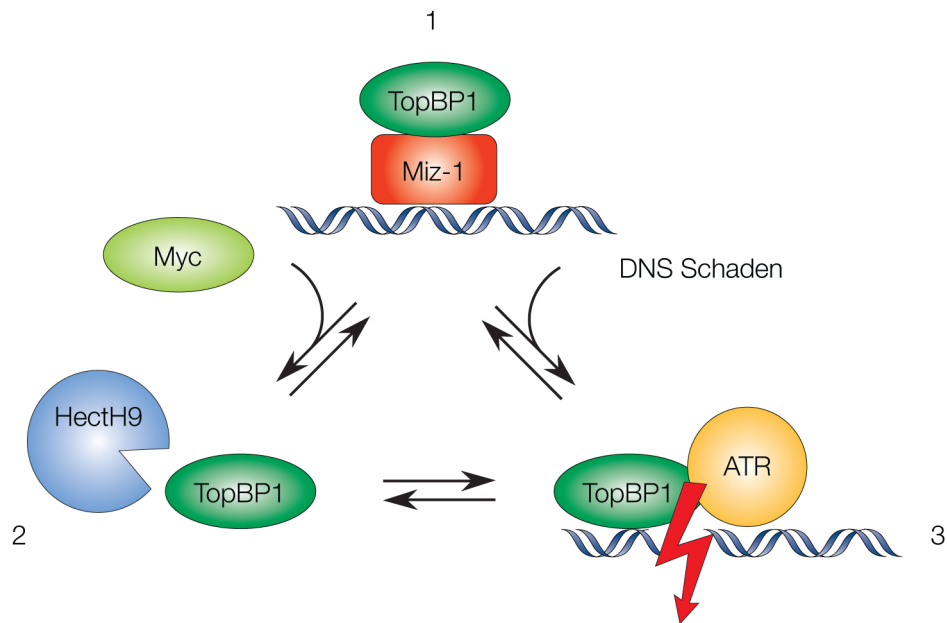
### 5.2.3. Myc moduliert die Aktivität von HectH9 auf TopBP1

Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte cMyc Mengen die Bindung von TopBP1 an Miz1 reduzieren (Abbildung 4.18). Herold u. a. (2008) wiesen eine Reduktion von TopBP1 nach cMyc Überexpression nach. Wurden cMyc überexprimierte Zellen mit einem Proteasominhibitor (MG132) behandelt, blieb die Gesamtmenge TopBP1 gleich, jedoch wurde es durch cMyc vom Chromatin in die lösliche Zellfraktion verdrängt. Diese Ergebnisse wurden durch Koimmunpräzipitation bestätigt: In HeLa Zellen bindet TopBP1 an Miz1. Wird cMyc überexprimiert, bindet dieses an Miz1 und verdrängt dadurch TopBP1 (Abbildung 4.18).

Zusammengenommen ergibt sich für die HectH9 abhängige Ubiquitinierung von TopBP1 folgendes Model (Abbildung 5.5): TopBP1 ist in der ungestressten Zellen durch Miz1 an Chromatin gebunden und so vor Degradation durch HectH9 geschützt. Werden Strangbrüche durch UV-B Licht induziert, kann TopBP1 zusammen mit ATR und Atrip die DNA Schadenskaskade initiieren und die Zelle arretieren. Ist der Schaden repariert, dissoziiert TopBP1 von ATR und Atrip und wird nun von HectH9 degradiert, um das DNA Schadenssignal zu beenden. Ist HectH9 überexprimiert, wird TopBP1 konstant abgebaut und die Zelle kann nach DNA Schaden nur noch unzureichend arretieren, da ohne TopBP1 die Aktivierung von ATR stark reduziert ist (Choi u. a., 2009).

#### 5.2.4. HectH9 Lokalisation wird durch DNA Schaden reguliert

HectH9 kann über verschiedene Substrate die DNA Schadensantwort beeinflussen. Durch Ubiquitinierung von TopBP1 (Abbildung 4.14) wird der Miz1 abhängige DNA Schadensarrest aufgehoben und der Wiedereintritt in den Zellzyklus beschleunigt. Durch Ubiquitinierung und anschließende Degradation von p53 wird der DNA schadensabhängige Arrest ebenfalls reduziert (Chen u. a., 2005). Um zu überprüfen, ob diese HectH9 Aktivitäten DNA schadensabhängig reguliert werden, wurde zusätzlich zu den in der Literatur bekannten Phosphorylierungen durch ATM und ATR (Matsuoka u. a., 2007; Mu u. a., 2007) überprüft, ob HectH9 *in silico* Konsensusmotive für Modifikationen aufweist, die für DNA Schadenssignalkaskaden typisch sind (Abbildung 4.1). Da die *in silico* Analysen außerdem sowohl NLS als auch NES Motive aufzeigten, wurde untersucht, ob sich die Lokalisation von HectH9 nach UV-B Bestrahlung verändert. Hierfür wurde eine Serie aminoterminaler HectH9 Deletionskonstrukte an GFP fusioniert (Abbildung 4.19), um so die Lokalisation von HectH9 in der lebenden Zelle verfolgen zu können. Die Deletionen wurden so gewählt, das jeweils eine putative Phosphorylierungsstelle oder das carboxyterminale NLS nicht mehr erhalten ist. Vergleiche dieser Konstrukte ermöglichen so einen Rückschluss wie die jeweiligen Motive die HectH9 Lokalisation beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass HectH9  $\Delta 5$  nach DNA Schadensinduktion sowohl im Zytoplasma, als auch nukleär vorliegt (Abbildung 4.22). Werden Serin 3816 und Tyrosin 3822 zu Alanin mutiert und können dem zu Folge dort nicht mehr phosphoryliert werden, ist das Protein nur noch im Zytoplasma nachzuweisen. Dies weist auf eine entscheidende Rolle von Serin 3816 und oder Tyrosin 3822 in der Lokalisation von HectH9 hin. Weitere Experimente müssen zeigen, ob diese Regulation von HectH9 durch ATM und ATR auch am wildtyp HectH9 reproduzieren lassen. Der Versuch, ein GFP HectH9 „full length“ Fusionsprotein herzustellen, welches mikroskopisch oder im Immunblot nachweisbar ist, war nicht erfolgreich. Deshalb müsste die Lokalisation von HectH9 vor und nach DNA Schaden durch immunhistochemische Methoden analysiert werden. Durch Verwendung von Punktmutanten könnte dann überprüft werden, ob HectH9, welches nicht mehr DNA schadensabhängig modifiziert werden kann eine reduzierte Ubiquitinierungsaktivität seiner Substrate hat.



**Abb. 5.5.: Model der Stabilitätsregulation von TopBP1 durch HectH9**

TopBP1 liegt in verschiedenen Komplexen vor: **1.** TopBP1 ist über Miz1 an DNA gebunden und so vor Degradation durch HectH9 geschützt. **2.** Überexpression von cMyc kann TopBP1 von Miz1 verdrängen, es wird löslich und kann von HectH9 degradiert werden. **3.** Nach DNA Schadensinduktion dissoziiert TopBP1 von Miz1, bindet ATR und Atrip und aktiviert die DNA Schadensantwort. Nachdem die DNA repariert wurde löst sich TopBP1 von der DNA und wird von HectH9 abgebaut.

### 5.2.5. Ausblick

HectH9 beeinflusst verschiedene, teilweise gegenläufige Signalwege: Durch Ubiquitinierung von cMyc kann es Zellzyklusprogression induzieren (Abbildung 4.7). Durch Abbau von TopBP1 (Herold u. a., 2008), CDC6 (Hall u. a., 2007) und p53 (Warr u. a., 2005) die DNA Schadensantwort reduzieren und Arrest und Apoptose vermindern. Die Ubiquitinierung und Degradation von Mcl1 (Zhong u. a., 2005), einem antiapoptotischem Protein, hat verstärkte Apoptose zur Folge. Auch Histone wurden als HectH9 Substrate beschrieben (Liu u. a., 2005). Um heraus zu finden, welche Zielgene von HectH9 wann und wo *in vivo* eine Rolle spielen, müsste ein transgenes Mausmodell charakterisiert werden. Konstitutive Desruptionen in der Maus (Tak Mak, persönliche Mitteilung) und *C. elegans* sind embryonal letal (Page u. a., 2007), und konditionelle HectH9 Deletionen wirken möglicherweise dominant negativ. Ein konditionell katalytisch inaktives HectH9 ist deshalb die beste Methode die genaue Rolle dieser E3 Ligase zu untersuchen. Nach UV-B Bestrahlung aktiviert TopBP1 mit weiteren Proteinen die DNA Schadenskaskade. Anschließend wird es von HectH9 abgebaut, um die Zellzyklus Progression wieder zu ermöglichen (Herold u. a., 2008). Durch die Überexpression von Miz1 wird TopBP1 an Chromatin rekrutiert und nicht mehr von HectH9 abgebaut. Überexpression von Miz1 stabilisiert neben TopBP1 und p53 auch ATR. Eine direkte Ubiquitinierung von ATR durch HectH9 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Weitere Experimente müssen deshalb zeigen, ob die Effekte von Miz1 auf ATR durch HectH9 vermittelt werden oder über andere Signalwege verlaufen. Zur Klärung könnten *in vitro* Experimente beitragen: Hier kann eindeutig direkte Ubiquitinierung nachgewiesen werden. Problematisch ist jedoch, dass alle beteiligten Proteine nur ineffizient *in vitro* translatiert werden können. Auch posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel Phosphorylierung von HectH9 durch ATR werden *in vitro* nicht berücksichtigt. Ebenso wichtig wäre es, die genaue Zusammensetzung der HectH9 Proteinkomplexe zu analysieren: Sowohl cMyc und Miz1 als auch TopBP1 können HectH9 binden. Des Weiteren wurde die Bindung von HectH9 unter anderem an p53, p14<sup>ARF</sup> und Mcl1 nachgewiesen. Unklar ist, wann diese Interaktionen auftreten, ob sie sich gegenseitig ausschließen und wo in der Zelle HectH9 diese Proteine bindet. Hierfür müssten neue Antikörper entwickelt werden, um endogenes HectH9 in Zellen nachzuweisen. So könnte auch analysiert werden, ob sich die Lokalisation von endogenem HectH9 nach UV-B Bestrahlung analog zu GFP markiertem HectH9 Konstrukten verändert (Abbildung 4.20). Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass HectH9 eine Schlüssel E3 Ligase für viele tumorrelevante Signalwege ist. Durch ihre wichtige



Rolle in der Myc abhängigen Transaktivierung und der DNA Schadens Kaskade stellt sie ein attraktives Ziel für die Krebstherapie dar. Um die genauen Zusammenhänge des HectH9 Miz1 Myc TopBP1 Netzwerks zu verstehen, müssen deshalb weitere Studien vorgenommen werden.

## 6. Zusammenfassung

Das Protoonkogen *c-myc* kodiert für den Transkriptionsfaktor cMyc, der als Heterodimer mit Max die Transkription von Zielgenen aktiviert und als ternärer Komplex mit Max und Miz1 die Transkription einer zweiten Klasse von Zielgenen reprimiert. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass HectH9, eine Ubiquitin E3 Ligase, endogen sowohl an cMyc als auch an Miz1 bindet. Miz1 wird im Gegensatz cMyc nicht von HectH9 modifiziert, kann aber die Ubiquitinierung von cMyc durch HectH9 inhibieren. Die Ubiquitinketten die HectH9 auf cMyc synthetisiert, sind über Lysin 63 verknüpft. Diese Modifikation führt nicht zu beschleunigtem Abbau von cMyc, sondern verändert dessen biologische Eigenschaften. Die Depletion von HectH9 durch shRNA reduziert die Fähigkeit von cMyc, Zielgene zu aktivieren. Die Repression von cMyc Zielgenen bleibt jedoch unbeeinflusst. Diese Ergebnisse lassen sich in Experimenten mit Myc KR6, einer cMyc Mutante die nicht mehr von HectH9 ubiquitiniert werden kann, bestätigen. Die Aktivierungsdefizienz von Myc KR6 zeigt sich in einer FACS-Analyse durch fehlende Induktion von Zellteilung und Apoptose. Während wildtyp cMyc bei gehungerten 3T3 Zellen Zellzyklusprogression und Zelltod induziert, verhalten sich Myc KR6 infizierte Zellen vergleichbar zu Kontrollzellen. Die Ursache hier für liegt in der Notwendigkeit der Ubiquitinierung von cMyc für die Rekrutierung von p300 an cMyc aktivierte Promotoren. Obwohl wildtyp cMyc und Myc KR6 gleich effizient an Zielpromotoren assoziieren, kann lediglich wildtyp cMyc die Histonacetyltransferase p300 binden, welche notwendig für Rekrutierung von generellen Transkriptionsfaktoren ist.

TopBP1 ist Bestandteil der DNA Schadenssignalkaskade und essentieller Aktivator von ATR nach DNA Schadensinduktion durch UV-B Strahlung. Zellen, die Miz1 überexprimieren zeigen Anzeichen von DNA Schaden und weisen verlängerte Halbwertszeiten von TopBP1 und ATR auf. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von HectH9 die Halbwertszeit von TopBP1 nach UV-B Strahlung im Vergleich zu Kontrollzellen reduziert und TopBP1 von HectH9 mit über Lysin 48 verknüpfte Polyubiquitinketten markiert wird. Diese Polyubiquitinierung wird von Miz1 gehemmt. Eine TopBP1 Mutante, die Miz1 nicht mehr binden kann, wird gegenüber wildtyp TopBP1 stärker ubiquitiniert

und schneller abgebaut.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die E3 Ligase HectH9 entscheidend den Zellzyklus vorantreibt, in dem sie durch Ubiquitinierung über Lysin 63 cMyc aktiviert und so die Zellzyklusprogression fördert und zusätzlich über Abbau von TopBP1 die Induktion von Zellzyklusrest reduziert. Diese onkogenen Eigenschaften werden besonders im Kolonkarzinom deutlich. Während in normalen Darmgewebe HectH9 mRNA in nur 10% aller untersuchten Proben schwach nachzuweisen ist, ist in 80% aller untersuchten Adenokarzinome die HectH9 Transkription erhöht.

**Schlüsselworte:**

HectH9, Ubiquitin, cMyc, Miz1, p300, TopBP1, DNA Schaden.

## 7. Summary

The proto-oncogene *c-myc* encodes for the transcription factor cMyc, which activates expression of target genes in a heterodimer with Max, and acts as a repressor in a ternary complex with Max and Miz1. In this work I show that the E3 ligase HectH9 interacts with both Miz1 and cMyc. Unlike cMyc, Miz1 is not ubiquitinated by HectH9 but acts as an inhibitor of cMyc ubiquitination by HectH9. This polyubiquitination is inter-linked via Lysine 63 and does not lead to increased degradation of cMyc, but alters its biological properties: Depletion of HectH9 by shRNA leads to reduced induction of cMyc target genes, while repression of cMyc target genes is unaltered. These experiments are supported by experiments with Myc KR6, a cMyc mutant which can not be ubiquitinated by HectH9: Myc KR6 fails to induce cell cycle progression and apoptosis in comparison to wild type cMyc in starved 3T3 fibroblasts. One cause for this lies in the inability of Myc KR6 to interact with the histone acetyltransferase p300: While both, wild type cMyc and Myc KR6 bind similarly to Myc target promoters, only wild type cMyc is capable of recruiting p300 which is needed for efficient binding of general transcription factors.

TopBP1 is an essential activator of ATR after DNA damage induction by UV-B exposition. Cells that over-express Miz1 show signs of DNA damage and have increased half life times of TopBP1 and ATR. I could show that over-expression of HectH9 reduces the half life of TopBP1 after DNA damage in comparison to control cells and that HectH9 polyubiquitinates TopBP1 via lysine 48 interlinked chains. This reaction is inhibited by over-expression of Miz1. A TopBP1 mutant, which does not bind to Miz1 anymore, is ubiquitinated stronger by HectH9 than wild type TopBP1.

Taken together these results show that HectH9 is an important cell cycle inducer by ubiquitinating and activating cMyc and thereby promoting cell cycle entry and in addition to that reducing DNA damage dependent cell cycle arrest by ubiquitinating and degrading TopBP1. These oncogenic properties are apparent in colon carcinomas: Although in normal colon tissue HectH9 is only detectable in 10% of all samples at a low level, it is highly transcribed in 80% of all analyzed colon carcinoma samples.

**Keywords:**

HectH9, ubiquitin, cMyc, Miz1, p300, TopBP1, DNA damage.

# A. Anhang

## A.1. Array Daten

**Tab. A.1.:** Expressionsdaten der 100 am stärksten durch Myc induzierten Gene von NIH-3T3 Zellen, die entweder wildtyp Myc oder MycKR6 überexprimieren

Gen	Unigene Cluster	CloneID	bekanntes Myc Zielgen	Log2 (Myc/Puro)	Log2 (KR6/Puro)
Kcnn4	Mm.9911	H3054H04		3,68	2,67
		H3003A09		3,57	3,05
Hmox1	Mm.276389	H3019A12	ja	3,28	0,92
		H3005E06		2,85	2,07
Prlpm	Mm.23585	H3018B06		2,6	0,4
Psmc2	Mm.243234	H3032C09		2,51	2,88
Csf1	Mm.795	H3057D05		2,37	1,28
	Mm.371975	H3055C04		2,34	1,68
5730454B08Rik	Mm.245357	H3031A07		2,3	2,01
Phgdh	Mm.16898	H3044G06	ja	2,24	1,76
Sparc	Mm.291442	H3116A04	ja	2,22	2,05
Mat2a	Mm.29815	H3015C02	ja	2,09	1,57
Eef2	Mm.289431	H3144H11	ja	2,08	1,83
2410005K20Rik	Mm.28291	H3124G11		2,03	2,02
Phgdh	Mm.16898	H3047A08	ja	2,03	1,42
Nol5a	Mm.29363	H3027H10	ja	2,01	1,39
Tcp1	Mm.32019	H3013C11		2	1,67
Phgdh 0	Mm.16898	H3022F05	ja	1,99	1,15
	Mm.312742	H3078E04		1,96	1,06
		H3134E06		1,94	1,78
Slc6a6	Mm.247352	H3049H09		1,88	1,21
Mthfd2	Mm.443	H3158E03	ja	1,86	0,88
4930570C03Rik	Mm.28955	H3055C02		1,86	1,11
Pttglip	Mm.28853	H3016A08		1,83	1,49
0	Mm.366840	H3059C11		1,82	1,7

Gen	Unigene Cluster	CloneID	bekanntes Myc Zielgen	Log2 (Myc/Puro)	Log2 (KR6/Puro)
6820402O20Rik	Mm.371242	H3020A04		1,79	1,39
2310043N10Rik	Mm.281895	H3091D05		1,78	0,8
Tnfrsf12a	Mm.28518	H3057E07		1,74	-0,03
Ywhag	Mm.233813	H3083C11		1,73	1,01
Gpt2	Mm.200423	H3083D09		1,72	1,01
D3Jfr1	Mm.277713	H3090G02		1,7	1,23
		H3041E09		1,7	1,1
Ssr2	Mm.7091	H3131A08		1,69	1,29
Ctsd	Mm.231395	H3156A10		1,68	2,06
Sfxn1	Mm.134191	H3026E07	ja	1,68	1,4
Hspa5	Mm.330160	H3051C06		1,68	0,54
Eno1	Mm.70666	H3027E08	ja	1,65	1,42
Ddx18	Mm.44219	H3089B09	ja	1,64	0,59
Bzw2	Mm.288669	H3018E10		1,63	1,2
Eno1	Mm.70666	H3027E09	ja	1,63	1,47
Sf3b1	Mm.279736	H3151G01		1,63	0,55
Slc3a2	Mm.4114	H3023A07		1,63	0,73
Adfp	Mm.381	H3144F06		1,62	1,02
Hspd1	Mm.371564	H3118C07	ja	1,6	1,04
Zfp9	Mm.106970	H3089H04		1,6	-0,77
Eno1	Mm.70666	H3027E07	ja	1,59	1,45
Ppp2r1a	Mm.294138	H3028E04		1,57	1,38
D3Jfr1	Mm.277713	H3025B12		1,56	1,74
Ier3	Mm.25613	H3057B07	ja	1,55	0,02
		H3011F02		1,54	1,53
Rpa1	Mm.180734	H3030A08		1,54	1,13
C330023M02Rik	Mm.33919	H3031B08		1,54	1,29
4933421G18Rik	Mm.240329	H3093A05		1,53	0,94
0	Mm.337499	H3036C09		1,53	1,67
Ddx18	Mm.44219	H3008E09	ja	1,53	0,64
Wdr5	Mm.28265	H3090E01		1,52	0,52
		H3085H12		1,52	0,75
Bat1a	Mm.126043	H3131G08		1,52	0,81
Mtap4	Mm.217318	H3019B10		1,52	1,41
		H3001H07		1,52	1,06
Gclc	Mm.89888	H3002G11	ja	1,51	0,27
		H3159A03		1,51	0,93

Gen	Unigene Cluster	CloneID	bekanntes Myc Zielgen	Log2 (Myc/Puro)	Log2 (KR6/Puro)
		H3089C07		1,51	-0,69
		H3016C03		1,49	0,1
Stip1	Mm.258633	H3032C08		1,49	1,03
0	Mm.327368	H3022H02		1,48	1,14
Eprs	Mm.154511	H3016F07	ja	1,48	1
Slc2a1	Mm.21002	H3015A08	ja	1,47	0,58
Pttglip	Mm.28853	H3044B12		1,47	0,87
Eif4a1	Mm.279821	H3011H05	ja	1,47	0,94
		H3048H10		1,46	0,84
Csnk1e	Mm.30199	H3041F08		1,46	1,24
Glg1	Mm.276271	H3052F04		1,46	1,41
Ddb1	Mm.289915	H3008E08	ja	1,45	1,48
Ssrp1	Mm.219793	H3004F09		1,44	1,32
Raly	Mm.370200	H3083E03		1,44	0,12
Chka	Mm.225505	H3088E07		1,43	0,5
Rpl7l1	Mm.218533	H3023F03		1,42	0,75
Pa2g4	Mm.4742	H3024B11	ja	1,42	0,66
AK129375	Mm.309520	H3051A08		1,42	1,12
Ddb1	Mm.289915	H3007D04	ja	1,41	0,96
Arhgef11	Mm.287267	H3096A01		1,4	-0,02
D8Ert812e	Mm.275720	H3022A06		1,4	0,34
1600010O03Rik	Mm.358815	H3001B11		1,4	1,05
5730454B08Rik	Mm.245357	H3034D08		1,39	1,06
B3gnt5	Mm.33935	H3023D03		1,39	0,61
4930438O05Rik	Mm.280013	H3031D07		1,38	1,42
		H3023B12		1,38	0,97
		H3048E11		1,38	0,89
Vps26	Mm.260703	H3085H07		1,38	1,14
Scmh1	Mm.208924	H3056B02		1,38	0,4
Sesn2	Mm.23608	H4054E12		1,38	0,85
Limd1	Mm.10987	H3019B05		1,37	1,14
Ssr2	Mm.7091	H3011C06		1,36	0,64
Eif4g2	Mm.185453	H3027A06		1,36	0,91
AA408296	Mm.173758	H3082B02		1,35	0,24
Mglap	Mm.243085	H3134C05		1,35	0,23
Dld	Mm.3131	H3144G11		1,34	1
Brd2	Mm.3444	H3119A06	ja	1,34	0,77



---

Gen	Unigene Cluster	CloneID	bekanntes Myc Zielgen	Log2 (Myc/Puro)	Log2 (KR6/Puro)
Mcm3	Mm.4502	H3026H03	ja	1,34	0,26

**Tab. A.2.:** Expressionsdaten der 100 am stärksten durch MycER induzierten Gene von U2OS Zellen, die entweder Kontroll- oder HectH9 shRNA exprimieren

Gen	Unigene Cluster	bekanntes Myc Zielgen	Log2(fache Induktion in Kontrollzellen)	Log2(fache Induktion in shHectH) Zellen
	Hs.554121		2,06	1,1
GLT25D2	Hs.387995		2	0,52
RGS16	Hs.413297	ja	1,67	0,94
ZNF207	Hs.500775		1,65	0,38
GPRC5B	Hs.148685		1,63	0,28
LOC163782	Hs.283398		1,62	- 0,74
KIAA0460	Hs.213666		1,61	0,78
CCDC3	Hs.498720		1,59	0,63
MALAT1	Hs.187199		1,51	- 0,75
CNTN3	Hs.12723		1,51	0,1
HLF	Hs.196952		1,5	0,98
TTYH2	Hs.27935		1,48	- 0,08
CD1D	Hs.1799		1,4	0,62
			1,36	0,31
	Hs.550845		1,36	0,94
MS4A4A	Hs.325960		1,33	- 0,37
STOM	Hs.253903		1,32	0,07
EPS8L3	Hs.485352		1,32	0,69
CA12	Hs.210995		1,18	0,79
SLC1A2	Hs.502338		1,18	0,57
SIP1	Hs.533862	ja	1,17	0,2
SEPHS1	Hs.124027		1,15	0,43
ABCA3	Hs.26630		1,15	0,24
DGAT2	Hs.334305		1,14	- 0,07
			1,13	- 0,25
FLJ31810	Hs.145642		1,11	0,82
			1,09	0,37
	Hs.550621		1,07	- 0,04
			1,07	- 0,52
SSBP4	Hs.515259		1,06	0,15

Gen	Unigene Cluster	bekanntes Myc Zielgen	Log2(fache Induktion in Kontrollzellen)	Log2(fache Induktion in shHectH) Zellen
PPP3CA	Hs.435512	ja	1,06	0,1
LRIG1	Hs.518055		1,04	0,07
	Hs.533401		1,03	0,11
LOC91614	Hs.280990		1,02	0,79
SLC7A5	Hs.513797	ja	1,02	0,27
COG1	Hs.283109		1,02	0,51
NTRK2	Hs.494312		1,02	1,87
	Hs.548513		1,01	0,5
SLC16A10	Hs.520321		1,01	0,28
			0,99	- 0,1
SSBP4	Hs.515259		0,99	- 0,2
DDC	Hs.359698		0,98	0,08
PTPRU	Hs.19718		0,98	0,73
			0,98	0,12
FXN	Hs.29978		0,98	0,16
CSPG5	Hs.45127		0,98	0,44
PDCD4	Hs.232543		0,98	0,03
KIF1A	Hs.516802		0,98	1,09
LOC339263	Hs.514016		0,96	0,36
			0,96	- 0,64
ABCC5	Hs.368563		0,95	- 0,11
	Hs.434957		0,95	0,99
ZNF138	Hs.530045		0,93	- 0,43
	Hs.547047		0,92	0,88
ARHGAP8	Hs.102336		0,92	0,73
LOC150946	Hs.187912		0,91	0,57
TFCP2	Hs.48849		0,91	- 0,06
MRPS7	Hs.71787	ja	0,9	0,56
PRKCB1	Hs.460355		0,9	- 0,44
PKMYT1	Hs.77783		0,9	0,05
GRINA	Hs.339697		0,9	0,55
			0,89	n.d.
			0,89	0,52
TTR	Hs.427202		0,89	0,07
C9orf125	Hs.254609		0,89	0,28

Gen	Unigene Cluster	bekanntes Myc Zielgen	Log2(fache Induktion in Kontrollzellen)	Log2(fache Induktion in shHectH Zellen)
LOC349114	Hs.414183		0,89	- 0,25
FLJ37034	Hs.24951		0,88	0,04
SCD	Hs.368641	ja	0,87	0
TNFRSF8	Hs.1314		0,87	- 0,21
	Hs.446700		0,87	0,46
EGFR	Hs.488293		0,86	0,38
PDZRN3	Hs.434900		0,86	- 0,32
TBCA	Hs.291212		0,86	- 0,07
ARC	Hs.40888		0,85	- 0,25
HSPA12A	Hs.524617		0,85	0,1
TTL4	Hs.471405		0,85	- 0,11
GPD1L	Hs.82432		0,84	0,56
	Hs.544780		0,84	n.d.
			0,84	- 0,1
CTNS	Hs.187667		0,84	- 0,41
WBSCR20B	Hs.549260		0,84	- 0,2
	Hs.529122		0,83	- 0,12
ARHGAP8	Hs.102336		0,83	0,35
PP3111	Hs.514599		0,82	0,24
CKMT2	Hs.80691		0,82	0,04
RASL11B	Hs.8035		0,82	0,77
GABRP	Hs.26225		0,82	0,56
RCN1	Hs.97887		0,82	n.d.
	Hs.437592		0,82	n.d.
FLJ22390	Hs.497816		0,81	0,36
FATE1	Hs.301960		0,81	0,01
EIF2C2	Hs.449415		0,81	- 0,13
APXL2	Hs.519574		0,8	0,36
SORL1	Hs.368592		0,8	0,52
MGC4170	Hs.46850		0,79	0,09
			0,79	- 0,17
ISGF3G	Hs.1706	ja	0,79	0,35
ZNF589	Hs.19585		0,79	- 0,25
CA10	Hs.463466		0,78	- 0,01
CYCS	Hs.437060	ja	0,78	0,06

## A.2. Abkürzungsverzeichnis

### A.2.1. Präfixe

Abkürzung	Vorsilbe	Faktor
p	Pico-	$10^{-12}$
n	Nano-	$10^{-9}$
$\mu$	Mikro-	$10^{-6}$
m	Milli-	$10^{-3}$
c	Centi-	$10^{-2}$
k	Kilo-	$10^3$

### A.2.2. Einheiten

**A** Ampere

**Da** Dalton

**g** Gramm

**l** Liter

**M** mol/l

**mol** Mol

**s** Sekunde

**U** Unit

**V** Volt

**W** Watt

**°C** Grad Celsius

### A.2.3. Proteine, Proteindomänen und andere Biomoleküle

**A** Adenin

**AS** Aminosäure

**ATP** Adenosin-5'-triphosphat

**bp** Basenpaar(e)

**C** Cytosin

**cDNA** komplementäre DNA, *complementary DNA*

**DNA** Desoxyribonukleinsäure, *desoxyribonucleic acid*

**dNTPs** Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate

**G** Guanin

**HRP** Meerrettich-Peroxidase, *horseradish peroxidase*

**IgG** Immunglobulin G

**nt** Nukleotid(e)

**T** Thymin

**TA** Transkriptionsaktivierung

**W** Tryptophan

#### **A.2.4. Lösungen und Chemikalien**

**APS** Ammoniumpersulfat

**BSA** Rinder-Serumalbumin, *bovine serum albumin*

**CHX** Cyclohexamid

**ddH<sub>2</sub>O** doppelt destilliertes Wasser

**DMEM** Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium

**DMSO** Dimethylsulfoxid

**DTT** Dithiothreitol

**EDTA** Ethylendiamintetraacetat

**FCS** Fötale Kälberserum, *fetal calf serum*

**PBS** Phosphat-gepufferte Salzlösung, *phosphate-buffered saline*

**PVDF** Polyvinylidenfluorid

**SDS** Natriumdodecylsulfat, *sodium dodecyl sulfate*

**TBS** Tris-gepufferte Salzlösung, *Tris-buffered saline*

**TBS-T** mit Tween-20 versetzte Tris-gepufferte Salzlösung

**TE** Tris-EDTA-Puffer

**TEMED** N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

**Tris** Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

### A.2.5. Andere Abkürzungen

**Abb.** Abbildung

**abs.** absolut

**AG** Aktiengesellschaft

**ATCC** American Type Culture Collection

**bzw.** beziehungsweise

**ca.** *circa*

**ChIP** Chromatinimmunpräzipitation

**CoIP** Coimmunpräzipitation

**Corp.** *Corporation*

**ECL** *enhanced chemoluminescence*

***E.coli*** *Escherichia coli*

**GmbH** Gesellschaft mit beschränkter Haftung

**Inc.** *Incorporated*

**IP** Immunpräzipitation

**KGaA** Kommanditgesellschaft auf Aktien

**NIH** National Institutes of Health (USA)

**PAGE** Polyacrylamid-Gelelektrophorese

**PCR** Polymerase-Kettenreaktion, *polymerase chain reaction*

**PDB** Protein Database, <http://www.rcsb.org/pdb/>

**qPCR** quantitative PCR

**rpm** Umdrehungen pro Minute, *rotations per minute*

**RT** Raumtemperatur

**Tab.** Tabelle

**ÜN** über Nacht; 16–20 h

**usw.** und so weiter

**v-** viral

**Vol.** Volumen

**v/v** Volumenanteil pro Volumen, *volume per volume*

**wt** Wildtyp

**w/v** Gewichtsanteil pro Volumen, *weight per volume*

**z. B.** zum Beispiel



## B. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Martin Eilers nicht nur für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe eine Doktorarbeit durchführen zu können, sondern besonders für die stetige Förderung weit über meine Zeit in der AG Eilers hinaus, die ständige Gesprächsbereitschaft und Geduld.

Ich danke allen Mitgliedern der AG Eilers, AG Bauer und AG Gaubatz, die mich einerseits durch gute Zusammenarbeit und Ratschläge, andererseits durch eine wunderbare Arbeitsatmosphäre immer unterstützt haben. Besonders hervorheben möchte ich hier Steffi Herold und Viola Paulus, die zur Verständlichkeit dieser Doktorarbeit nicht unwesentlich beigetragen haben.

Für Hilfestellung bei Versuchen danke ich Steffi Herold, Sovana Adhikary, Till Kortüm, Bianca Jebavy und Doris Dobrin.

Ebenso möchte ich mich bei Hermann H. Kalwa und Fabienne Schmit bedanken, die immer zur richtigen Zeit am richtigen Ort waren.

Meiner Familie, vor allem meiner Frau Viola und meinen Eltern danke ich für die beste Unterstützung in jeder Situation.

Till, Caroline and Nikita: You were indispensable for this thesis as well as for several barbecue parties. It was great working with you.

Ich danke dem Mensa-Club für wunderbare Gesellschaft - nicht nur beim Mittagessen.

## Literaturverzeichnis

[Abraham 2001]

ABRAHAM, R. T.: Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. In: *Genes Dev* 15 (2001), Nr. 17, S. 2177–96.

[Adhikary u. a. 2003]

ADHIKARY, S. ; PEUKERT, K. ; KARSUNKY, H. ; BEUGER, V. ; LUTZ, W. ; ELSASSER, H. P. ; MOROY, T. ; EILERS, M.: Miz1 is required for early embryonic development during gastrulation. In: *Mol Cell Biol* 23 (2003), Nr. 21, S. 7648–57. – 22921910 0270-7306 Journal Article

[Adhikary u. Eilers 2005]

ADHIKARY, Sovana ; EILERS, Martin: Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005), Aug, Nr. 8, S. 635–645. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1703>. – DOI 10.1038/nrm1703. – ISSN 1471–0072 (Print)

[Adhikary u. a. 2005]

ADHIKARY, Sovana ; MARINONI, Federica ; HOCK, Andreas ; HULLEMAN, Esther ; POPOV, Nikita ; BEIER, Rudi ; BERNARD, Sandra ; QUARTO, Micaela ; CAPRA, Maria ; GOETTIG, Stephan ; KOGEL, Ulrike ; SCHEFFNER, Martin ; HELIN, Kristian ; EILERS, Martin: The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. In: *Cell* 123 (2005), Nr. 3, S. 409–421. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.016>. – DOI 10.1016/j.cell.2005.08.016. – ISSN 0092–8674 (Print)

[Ahmad u. a. 1998]

AHMAD, K. F. ; ENGEL, C. K. ; PRIVE, G. G.: Crystal structure of the BTB domain from PLZF. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Nr. 21, S. 12123–8. – 98445335 0027-8424 Journal Article

[Amati u. a. 1993]

AMATI, B. ; BROOKS, M.W. ; LEVY, N. ; LITTLEWOOD, T.D. ; EVAN, G.I. ; LAND, H.: Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. In: *Cell* 72 (1993), S. 233–245

[Amati u. a. 2001]

AMATI, B. ; FRANK, S. R. ; DONJERKOVIC, D. ; TAUBERT, S.: Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription. In: *Biochim Biophys Acta* 1471 (2001), Nr. 3, S. M135–45.

[Aravind 2001]

ARAVIND, L: The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation. In: *Trends Biochem Sci* 26 (2001), Nr. 5, S. 273–275. – ISSN 0968–0004 (Print)

[Axelson u. a. 1995]

AXELSON, H. ; HENRIKSSON, M. ; WANG, Y. ; MAGNUSSON, K. P. ; KLEIN, G.: The amino-terminal phosphorylation sites of C-MYC are frequently mutated in Burkitt's lymphoma lines but not in mouse plasmacytomas and rat immunocytomas. In: *Eur J Cancer* 31a (1995), Nr. 12, S. 2099–104 Issn: 0959–8049

[Bahram u. a. 2000]

BAHRAM, F. ; LEHR, N. von d. ; CETINKAYA, C. ; LARSSON, L. G.: c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover. In: *Blood* 95 (2000), Nr. 6, S. 2104–10. – 0006-4971 Journal Article

[Bannister u. Kouzarides 1996]

BANNISTER, A J. ; KOUZARIDES, T: The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. In: *Nature* 384 (1996), Nr. 6610, S. 641–643. <http://dx.doi.org/10.1038/384641a0>. – DOI 10.1038/384641a0. – ISSN 0028–0836 (Print)

[Bardwell u. Treisman 1994]

BARDWELL, V.J. ; TREISMAN, R.: The POZ domain: A conserved protein-protein interaction motif. In: *Genes Dev.* 8 (1994), S. 1664–1677

[Berns u. a. 2000]

BERNS, K. ; HIJMANS, E. M. ; KOH, E. ; DALEY, G. Q. ; BERNARDS, R.: A genetic screen to identify genes that rescue the slow growth phenotype of c-myc null fibroblasts. In: *Oncogene* 19 (2000), Nr. 29, S. 3330–4. – 20374014 0950-9232 Journal Article

[Biel u. a. 2005]

BIEL, Markus ; WASCHOLOWSKI, Veit ; GIANNIS, Athanassios: Epigenetics–

an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes. In: *Angew Chem Int Ed Engl* 44 (2005), Nr. 21, S. 3186–3216. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200461346>. – DOI 10.1002/anie.200461346. – ISSN 1433–7851 (Print)

[Blackwell u. a. 1990]

BLACKWELL, T.K. ; KRETZNER, L. ; BLACKWOOD, E.M. ; EISENMAN, R.N. ; WEINTRAUB, H.: Sequence-specific DNA binding by the c-myc protein. In: *Science* 250 (1990), S. 1149–1151

[Blackwood u. a. 1992]

BLACKWOOD, E.M. ; LÜSCHER, B. ; EISENMAN, R.N.: Myc and Max associate in vivo. In: *Genes Dev.* 6 (1992), S. 71–80

[Bodmer 1994]

BODMER, W F.: Cancer genetics. In: *Br Med Bull* 50 (1994 Jul), Nr. 3, S. 517–526. – ISSN 0007–1420 (Print)

[Bouchard u. a. 1999]

BOUCHARD, C. ; THIEKE, K. ; MAIER, A. ; SAFFRICH, R. ; HANLEY-HYDE, J. ; ANSORGE, W. ; REED, S. ; SICINSKI, P. ; BARTEK, J. ; M.EILERS: Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle induction and sequestration of p27. In: *Embo J.* 18 (1999), S. 5321–5333

[Bres u. a. 2003]

BRES, V. ; KIERNAN, R. E. ; LINARES, L. K. ; CHABLE-BESSIA, C. ; PLECHAKOVA, O. ; TREAND, C. ; EMILIANI, S. ; PELOPONESE, J. M. ; JEANG, K. T. ; COUX, O. ; SCHEFFNER, M. ; BENKIRANE, M.: A non-proteolytic role for ubiquitin in Tat-mediated transactivation of the HIV-1 promoter. In: *Nat Cell Biol* 5 (2003), Nr. 8, S. 754–61. – 1465-7392 Journal Article

[Chen u. a. 2005]

CHEN, Delin ; KON, Ning ; LI, Muyang ; ZHANG, Wenzhu ; QIN, Jun ; GU, Wei: ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. In: *Cell* 121 (2005), Nr. 7, S. 1071–1083. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.037>. – DOI 10.1016/j.cell.2005.03.037. – ISSN 0092–8674 (Print)

[Choi u. a. 2009]

CHOI, JH ; LINDSEY-BOLTZ, LA ; SANCAR, A: Cooperative activation of the ATR checkpoint kinase by TopBP1 and damaged DNA. In: *Nucleic*

*Acids Res* (2009 Jan 12). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn1075>. – DOI 10.1093/nar/gkn1075. – ISSN 1362–4962 (Electronic)

[Claassen u. Hann 1999]

CLAASSEN, G F. ; HANN, S R.: Myc-mediated transformation: the repression connection. In: *Oncogene* 18 (1999 May 13), Nr. 19, S. 2925–2933. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1202747>. – DOI 10.1038/sj.onc.1202747. – ISSN 0950–9232 (Print)

[Coller u. a. 2000]

COLLER, H. A. ; GRANDORI, C. ; TAMAYO, P. ; COLBERT, T. ; LANDER, E. S. ; EISENMAN, R. N. ; GOLUB, T. R.: Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000), Nr. 7, S. 3260–5

[Comings 1973]

COMINGS, D E.: A general theory of carcinogenesis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 70 (1973 Dec), Nr. 12, S. 3324–3328. – ISSN 0027–8424 (Print)

[Coux u. a. 1996]

COUX, O. ; TANAKA, K. ; GOLDBERG, A. L.: Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. In: *Annu Rev Biochem* 65 (1996), S. 801–47. – 0066-4154 Journal Article Review Review, Academic

[Dalla-Favera u. a. 1982]

DALLA-FAVERA, R ; GELMANN, E P. ; MARTINOTTI, S ; FRANCHINI, G ; PAPPAS, T S. ; GALLO, R C. ; WONG-STAAAL, F: Cloning and characterization of different human sequences related to the onc gene (v-myc) of avian myelocytomatosis virus (MC29). In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (1982), Nr. 21, S. 6497–6501. – ISSN 0027–8424 (Print)

[Dang 1999]

DANG, C. V.: c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. In: *Mol Cell Biol* 19 (1999), Nr. 1, S. 1–11

[Davis u. a. 1993]

DAVIS, A.C. ; WIMS, M. ; SPOTTS, G.D. ; HANN, S.R. ; BRADLEY, A.: A null c-myc mutation causes lethality before 10.5 days of gestation in homozygotes and reduced fertility in heterozygous female mice. In: *Genes Dev.* 7 (1993), S. 671–682

[Deveraux u. a. 1994]

DEVERAUX, Q ; USTRELL, V ; PICKART, C ; RECHSTEINER, M: A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. In: *J Biol Chem* 269 (1994), Mar, Nr. 10, S. 7059–7061. – ISSN 0021–9258 (Print)

[Dhordain u. a. 1995]

DHORDAIN, P. ; ALBAGLI, O. ; ANSIEAU, S. ; KOKEN, M. H. ; DEWEINDT, C. ; QUIEF, S. ; LANTOINE, D. ; LEUTZ, A. ; KERCKAERT, J. P. ; LEPRINCE, D.: The BTB/POZ domain targets the LAZ3/BCL6 oncoprotein to nuclear dots and mediates homomerisation in vivo. In: *Oncogene* 11 (1995), Nr. 12, S. 2689–97 Issn: 0950–9232

[Dubiel u. Gordon 1999]

DUBIEL, W. ; GORDON, C.: Ubiquitin pathway: another link in the polyubiquitin chain? In: *Curr Biol* 9 (1999), Nr. 15, S. R554–7. – 0960-9822 Journal Article Review Review, Tutorial

[Eilers u. a. 1991]

EILERS, M. ; SCHIRM, S. ; BISHOP, J.M.: The MYC protein activates transcription of the alpha-prothymosin gene. In: *Embo J* 10 (1991), S. 133–41

[Facchini u. Penn 1998]

FACCHINI, L. M. ; PENN, L. Z.: The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. In: *Faseb J* 12 (1998), Nr. 9, S. 633–51

[Fang u. a. 2000]

FANG, S. ; JENSEN, J. P. ; LUDWIG, R. L. ; VOUSDEN, K. H. ; WEISSMAN, A. M.: Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 12, S. 8945–51. – 20187618 0021-9258 Journal Article

[Fernandez u. a. 2003]

FERNANDEZ, P. C. ; FRANK, S. R. ; WANG, L. ; SCHROEDER, M. ; LIU, S. ; GREENE, J. ; COCITO, A. ; AMATI, B.: Genomic targets of the human c-Myc protein. In: *Genes Dev* 17 (2003), Nr. 9, S. 1115–29. – 22615690 0890-9369 Journal Article

[Fero u. a. 1998]

FERO, M. L. ; RANDEL, E. ; GURLEY, K. E. ; ROBERTS, J. M. ; KEMP, C. J.:

The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. In: *Nature* 396 (1998), Nr. 6707, S. 177–80

[Flick u. a. 2004]

FLICK, K. ; OUNI, I. ; WOHLSCHEGEL, J. A. ; CAPATI, C. ; McDONALD, W. H. ; YATES, J. R. ; KAISER, P.: Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain. In: *Nat Cell Biol* 6 (2004), Nr. 7, S. 634–41. – 1465-7392 Journal Article

[Giles 2004]

GILES, Jim: Chemistry Nobel for trio who revealed molecular death-tag. In: *Nature* 431 (2004), Nr. 7010, S. 729. <http://dx.doi.org/10.1038/431729a>. – DOI 10.1038/431729a. – ISSN 1476–4687 (Electronic)

[Gomez-Roman u. a. 2003]

GOMEZ-ROMAN, Natividad ; GRANDORI, Carla ; EISENMAN, Robert N. ; WHITE, Robert J.: Direct activation of RNA polymerase III transcription by c-Myc. In: *Nature* 421 (2003), Nr. 6920, S. 290–294. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01327>. – DOI 10.1038/nature01327. – ISSN 0028–0836 (Print)

[Gregory u. Hann 2000]

GREGORY, M. A. ; HANN, S. R.: c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. In: *Mol Cell Biol* 20 (2000), Nr. 7, S. 2423–35.

[Grewal u. a. 2005]

GREWAL, Savraj S. ; LI, Ling ; ORIAN, Amir ; EISENMAN, Robert N. ; EDGAR, Bruce A.: Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during Drosophila development. In: *Nat Cell Biol* 7 (2005), Nr. 3, S. 295–302. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1223>. – DOI 10.1038/ncb1223. – ISSN 1465–7392 (Print)

[Grignani u. a. 1998]

GRIGNANI, F. ; KINSELLA, T. ; MENCARELLI, A. ; VALTIERI, M. ; RIGANELLI, D. ; LANFRANCONE, L. ; PESCHLE, C. ; NOLAN, G. P. ; PELICCI, P. G.: High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. In: *Cancer Res* 58 (1998), Nr. 1, S. 14–9

[Guo u. a. 2000]

GUO, Q. M. ; MALEK, R. L. ; KIM, S. ; CHIAO, C. ; HE, M. ; RUFFY, M. ;

SANKA, K. ; LEE, N. H. ; DANG, C. V. ; LIU, E. T.: Identification of c-myc responsive genes using rat cDNA microarray. In: *Cancer Res* 60 (2000), Nr. 21, S. 5922–8

[Hall u. a. 2007]

HALL, Jonathan R. ; KOW, Evelyn ; NEVIS, Kathleen R. ; LU, Chiajung K. ; LUCE, K S. ; ZHONG, Qing ; COOK, Jeanette G.: Cdc6 stability is regulated by the Huwe1 ubiquitin ligase after DNA damage. In: *Mol Biol Cell* 18 (2007), Nr. 9, S. 3340–3350. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E07-02-0173>. – DOI 10.1091/mbc.E07-02-0173. – ISSN 1059–1524 (Print)

[Harris u. a. 1988]

HARRIS, A. W. ; PINKERT, C. A. ; CRAWFORD, M. ; LANGDON, W. Y. ; BRINSTER, R. L. ; ADAMS, J. M.: The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells. In: *J Exp Med* 167 (1988), Nr. 2, S. 353–71

[Harvey Lodish 2000]

HARVEY LODISH, Lawrence S. Zipursky Paul Matsudaira David Baltimore James D.: *Molecular Cell Biology*. Fourth Edition. W. H. FREEMAN, 2000

[Haupt u. a. 1997]

HAUPT, Y ; MAYA, R ; KAZAZ, A ; OREN, M: Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. In: *Nature* 387 (1997), May, Nr. 6630, S. 296–299. <http://dx.doi.org/10.1038/387296a0>. – DOI 10.1038/387296a0. – ISSN 0028–0836 (Print)

[Hemann u. a. 2005]

HEMANN, Michael T. ; BRIC, Anka ; TERUYA-FELDSTEIN, Julie ; HERBST, Andreas ; NILSSON, Jonas A. ; CORDON-CARDO, Carlos ; CLEVELAND, John L. ; TANSEY, William P. ; LOWE, Scott W.: Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. In: *Nature* 436 (2005), Nr. 7052, S. 807–811. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03845>. – DOI 10.1038/nature03845. – ISSN 1476–4687 (Electronic)

[Henriksson u. Lüscher 1996]

HENRIKSSON, M. ; LÜSCHER, B.: Proteins of the Myc network: Essential regulators of cell growth and differentiation. In: *Cancer Research* 68 (1996), S. 109–182



[Herold u. a. 2008]

HEROLD, Steffi ; HOCK, Andreas ; HERKERT, Barbara ; BERNIS, Katrien ; MULLENDERS, Jasper ; BEIJERSBERGEN, Roderick ; BERNARDS, Rene ; EILERS, Martin: Miz1 and HectH9 regulate the stability of the checkpoint protein, TopBP1. In: *EMBO J* 27 (2008 Nov 5), Nr. 21, S. 2851–2861. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2008.200>. – DOI 10.1038/emboj.2008.200. – ISSN 1460–2075 (Electronic)

[Herold u. a. 2002]

HEROLD, Steffi ; WANZEL, Michael ; BEUGER, Vincent ; FROHME, Carsten ; BEUL, Dorothee ; HILLUKKALA, Tomi ; SYVAOJA, Juhani ; SALUZ, Hans-Peter ; HAENEL, Frank ; EILERS, Martin: Negative regulation of the mammalian UV response by Myc through association with Miz-1. In: *Mol Cell* 10 (2002), Nr. 3, S. 509–521. – ISSN 1097–2765 (Print)

[Hershko u. Ciechanover 1998]

HERSHKO, A ; CIECHANOVER, A: The ubiquitin system. In: *Annu Rev Biochem* 67 (1998), S. 425–479. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425>. – DOI 10.1146/annurev.biochem.67.1.425. – ISSN 0066–4154 (Print)

[Hoegel u. a. 2002]

HOEGE, C. ; PFANDER, B. ; MOLDOVAN, G. L. ; PYROWOLAKIS, G. ; JENTSCH, S.: RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. In: *Nature* 419 (2002), Nr. 6903, S. 135–41. – 0028-0836 Journal Article

[Hofmann u. Bucher 1996]

HOFMANN, K ; BUCHER, P: The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. In: *Trends Biochem Sci* 21 (1996), Nr. 5, S. 172–173. – ISSN 0968–0004 (Print)

[Honda u. a. 1997]

HONDA, R. ; TANAKA, H. ; YASUDA, H.: Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. In: *FEBS Lett* 420 (1997), Nr. 1, S. 25–7. – 0014-5793 Journal Article

[Huibregtse u. a. 1995]

HUIBREGTSE, J M. ; SCHEFFNER, M ; BEAUDENON, S ; HOWLEY, P M.: A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-

protein ligase. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), Mar, Nr. 7, S. 2563–2567.  
– ISSN 0027–8424 (Print)

[Imai u. a. 2002]

IMAI, Yuzuru ; SODA, Mariko ; HATAKEYAMA, Shigetsugu ; AKAGI, Takumi ;  
HASHIKAWA, Tsutomu ; NAKAYAMA, Kei I. ; TAKAHASHI, Ryosuke: CHIP is  
associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and  
enhances its ubiquitin ligase activity. In: *Mol Cell* 10 (2002), Nr. 1, S. 55–67.  
– ISSN 1097–2765 (Print)

[Jackson u. a. 2000a]

JACKSON, P. K. ; ELDRIDGE, A. G. ; FREED, E. ; FURSTENTHAL, L. ; HSU,  
J. Y. ; KAISER, B. K. ; REIMANN, J. D.: The lore of the RINGs: substrate  
recognition and catalysis by ubiquitin ligases. In: *Trends Cell Biol* 10 (2000),  
Nr. 10, S. 429–39. – 0962-8924 Journal Article Review Review Literature

[Jackson u. a. 2000b]

JACKSON, P. K. ; ELDRIDGE, A. G. ; FREED, E. ; FURSTENTHAL, L. ; HSU, J. Y.  
; KAISER, B. K. ; REIMANN, J. D.: The lore of the RINGs: substrate recognition  
and catalysis by ubiquitin ligases. In: *Trends Cell Biol* 10 (2000), Oct, Nr. 10,  
S. 429–439. – ISSN 0962–8924 (Print)

[Jackson u. Eldridge 2002]

JACKSON, Peter K. ; ELDRIDGE, Adam G.: The SCF ubiquitin ligase: an  
extended look. In: *Mol Cell* 9 (2002), May, Nr. 5, S. 923–925. – ISSN 1097–  
2765 (Print)

[Joazeiro u. Weissman 2000]

JOAZEIRO, C. A. ; WEISSMAN, A. M.: RING finger proteins: mediators of  
ubiquitin ligase activity. In: *Cell* 102 (2000), Sep, Nr. 5, S. 549–552. – ISSN  
0092–8674 (Print)

[Kim u. a. 2007]

KIM, Hyoungh T. ; KIM, Kwang P. ; LLEDIAS, Fernando ; KISSELEV, Alexei F.  
; SCAGLIONE, K. M. ; SKOWYRA, Dorota ; GYGI, Steven P. ; GOLDBERG,  
Alfred L.: Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin-  
protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains con-  
taining all possible isopeptide linkages. In: *J Biol Chem* 282 (2007), Jun,  
Nr. 24, S. 17375–86. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M609659200>. – DOI  
10.1074/jbc.M609659200

[Kim u. Huibregtse 2009]

KIM, Hyung C. ; HUIBREGTSE, Jon M.: Polyubiquitination by HECT E3s and the determinants of chain type specificity. In: *Mol Cell Biol* 29 (2009), Jun, Nr. 12, S. 3307–18. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00240-09>. – DOI 10.1128/MCB.00240-09

[Knudson 1971]

KNUDSON, A G J.: Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 68 (1971 Apr), Nr. 4, S. 820–823. – ISSN 0027–8424 (Print)

[Koch u. a. 2007]

KOCH, Heike B. ; ZHANG, Ru ; VERDOODT, Berlinda ; BAILEY, Aaron ; ZHANG, Chang-Dong ; YATES, John R 3. ; MENSSEN, Antje ; HERMEKING, Heiko: Large-scale identification of c-MYC-associated proteins using a combined TAP/MudPIT approach. In: *Cell Cycle* 6 (2007), Nr. 2, S. 205–217. – ISSN 1551–4005 (Electronic)

[Koegl u. a. 1999]

KOEGEL, M ; HOPPE, T ; SCHLENKER, S ; ULRICH, H D. ; MAYER, T U. ; JENTSCH, S: A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. In: *Cell* 96 (1999), Nr. 5, S. 635–644. – ISSN 0092–8674 (Print)

[Koonin u. a. 1996]

KOONIN, E V. ; ALTSCHUL, S F. ; BORK, P: BRCA1 protein products ... Functional motifs... In: *Nat Genet* 13 (1996), Nr. 3, S. 266–268. <http://dx.doi.org/10.1038/ng0796-266>. – DOI 10.1038/ng0796-266. – ISSN 1061–4036 (Print)

[Kubbutat u. a. 1997]

KUBBUTAT, M H. ; JONES, S N. ; VOUSDEN, K H.: Regulation of p53 stability by Mdm2. In: *Nature* 387 (1997), May, Nr. 6630, S. 299–303. <http://dx.doi.org/10.1038/387299a0>. – DOI 10.1038/387299a0. – ISSN 0028–0836 (Print)

[Kumagai u. Dunphy 2006]

KUMAGAI, Akiko ; DUNPHY, William G.: How cells activate ATR. In: *Cell Cycle* 5 (2006), Nr. 12, S. 1265–1268. – ISSN 1551–4005 (Electronic)

[Lam u. a. 2002]

LAM, Y A. ; LAWSON, T G. ; VELAYUTHAM, Murugesan ; ZWEIER, Jay L.

; PICKART, Cecile M.: A proteasomal ATPase subunit recognizes the poly-ubiquitin degradation signal. In: *Nature* 416 (2002), Apr, Nr. 6882, S. 763–767. <http://dx.doi.org/10.1038/416763a>. – DOI 10.1038/416763a. – ISSN 0028–0836 (Print)

[Land u. a. 1983]

LAND, H. ; PARADA, L. F. ; WEINBERG, R. A.: Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. In: *Nature* 304 (1983), Nr. 5927, S. 596–602

[von der Lehr u. a. 2003]

LEHR, N. von d. ; JOHANSSON, S. ; WU, S. ; BAHRAM, F. ; CASTELL, A. ; CETINKAYA, C. ; HYDBRING, P. ; WEIDUNG, I. ; NAKAYAMA, K. ; NAKAYAMA, K. I. ; SODERBERG, O. ; KERPPOLA, T. K. ; LARSSON, L. G.: The F-Box Protein Skp2 Participates in c-Myc Proteasomal Degradation and Acts as a Cofactor for c-Myc-Regulated Transcription. In: *Mol Cell* 11 (2003), Nr. 5, S. 1189–200. – 22656464 1097-2765 Journal Article

[Li u. Zou 2005]

LI, Lei ; ZOU, Lee: Sensing, signaling, and responding to DNA damage: organization of the checkpoint pathways in mammalian cells. In: *J Cell Biochem* 94 (2005), Nr. 2, S. 298–306. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.20355>. – DOI 10.1002/jcb.20355. – ISSN 0730–2312 (Print)

[Liu u. a. 2006]

LIU, Kang ; PAIK, Jason C. ; WANG, Bing ; LIN, Fang-Tsyr ; LIN, Weei-Chin: Regulation of TopBP1 oligomerization by Akt/PKB for cell survival. In: *EMBO J* 25 (2006), Nr. 20, S. 4795–4807. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601355>. – DOI 10.1038/sj.emboj.7601355. – ISSN 0261–4189 (Print)

[Liu u. a. 2007]

LIU, Zhiqian ; MIAO, Dengsheng ; XIA, Qingwen ; HERMO, Louis ; WING, Simon S.: Regulated expression of the ubiquitin protein ligase, E3(Histone)/LASU1/Mule/ARF-BP1/HUWE1, during spermatogenesis. In: *Dev Dyn* 236 (2007), Nr. 10, S. 2889–2898. <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.21302>. – DOI 10.1002/dvdy.21302. – ISSN 1058–8388 (Print)

[Liu u. a. 2005]

LIU, Zhiqian ; OUGHTRED, Rose ; WING, Simon S.: Characterization of E3Histone, a novel testis ubiquitin protein ligase which ubiquitinates histones.

In: *Mol Cell Biol* 25 (2005), Nr. 7, S. 2819–2831. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.25.7.2819-2831.2005>. – DOI 10.1128/MCB.25.7.2819–2831.2005. – ISSN 0270–7306 (Print)

[Makiniemi u. a. 2001]

MAKINIEMI, M ; HILLUKKALA, T ; TUUSA, J ; REINI, K ; VAARA, M ; HUANG, D ; POSPIECH, H ; MAJURI, I ; WESTERLING, T ; MAKELA, T P. ; SYVAOJA, J E.: BRCT domain-containing protein TopBP1 functions in DNA replication and damage response. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nr. 32, S. 30399–30406. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M102245200>. – DOI 10.1074/jbc.M102245200. – ISSN 0021–9258 (Print)

[Matsuoka u. a. 2007]

MATSUOKA, Shuhei ; BALLIF, Bryan A. ; SMOGORZEWSKA, Agata ; MCDONALD, E Robert 3. ; HUROV, Kristen E. ; LUO, Ji ; BAKALARSKI, Corey E. ; ZHAO, Zhenming ; SOLIMINI, Nicole ; LERENTHAL, Yaniv ; SHILOH, Yosef ; GYGI, Steven P. ; ELLEDGE, Stephen J.: ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. In: *Science* 316 (2007), Nr. 5828, S. 1160–1166. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1140321>. – DOI 10.1126/science.1140321. – ISSN 1095–9203 (Electronic)

[McGrath u. a. 1991]

MCGRATH, J. P. ; JENTSCH, S. ; VARSHAVSKY, A.: UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. In: *EMBO J* 10 (1991), Nr. 1, 227–236. <http://www.hubmed.org/display.cgi?uids=1989885>

[Morgenstern u. Land 1990]

MORGENSTERN, J. P. ; LAND, H.: Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. In: *Nucleic Acids Res* 18 (1990), Nr. 12, S. 3587–3596

[Mosesson u. a. 2003]

MOSESSON, Yaron ; SHTIEGMAN, Keren ; KATZ, Menachem ; ZWANG, Yaara ; VEREB, Gyorgi ; SZOLLOSI, Janos ; YARDEN, Yosef: Endocytosis of receptor tyrosine kinases is driven by monoubiquitylation, not polyubiquitylation. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Nr. 24, S. 21323–21326. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C300096200>. – DOI 10.1074/jbc.C300096200. – ISSN 0021–9258 (Print)

[Mu u. a. 2007]

MU, Jung-Jung ; WANG, Yi ; LUO, Hao ; LENG, Mei ; ZHANG, Jinglan ; YANG, Tao ; BESUSSO, Dario ; JUNG, Sung Y. ; QIN, Jun: A proteomic analysis of ataxia telangiectasia-mutated (ATM)/ATM-Rad3-related (ATR) substrates identifies the ubiquitin-proteasome system as a regulator for DNA damage checkpoints. In: *J Biol Chem* 282 (2007), Nr. 24, S. 17330–17334. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C700079200>. – DOI 10.1074/jbc.C700079200. – ISSN 0021–9258 (Print)

[Mullis u. Faloona 1987]

MULLIS, K B. ; FALOONA, F A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: *Methods Enzymol* 155 (1987), S. 335–350. – ISSN 0076–6879 (Print)

[Nikiforov u. a. 2002]

NIKIFOROV, M. A. ; CHANDRIANI, S. ; O'CONNELL, B. ; PETRENKO, O. ; KOTENKO, I. ; BEAVIS, A. ; SEDIVY, J. M. ; COLE, M. D.: A functional screen for Myc-responsive genes reveals serine hydroxymethyltransferase, a major source of the one-carbon unit for cell metabolism. In: *Mol Cell Biol* 22 (2002), Nr. 16, S. 5793–800. – 22133593 0270-7306 Journal Article

[Niklinski u. a. 2000]

NIKILINSKI, J. ; CLAASSEN, G. ; MEYERS, C. ; GREGORY, M. A. ; ALLEGRA, C. J. ; KAYE, F. J. ; HANN, S. R. ; ZAJAC-KAYE, M.: Disruption of Myc-tubulin interaction by hyperphosphorylation of c-Myc during mitosis or by constitutive hyperphosphorylation of mutant c-Myc in Burkitt's lymphoma. In: *Mol Cell Biol* 20 (2000), Nr. 14, S. 5276–84.

[Page u. a. 2007]

PAGE, Barbara D. ; DIEDE, Scott J. ; TENLEN, Jennifer R. ; FERGUSON, Edwin L.: EEL-1, a Hect E3 ubiquitin ligase, controls asymmetry and persistence of the SKN-1 transcription factor in the early *C. elegans* embryo. In: *Development* 134 (2007), Nr. 12, S. 2303–2314. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.02855>. – DOI 10.1242/dev.02855. – ISSN 0950–1991 (Print)

[Patel u. McMahon 2006]

PATEL, Jagruti H. ; MCMAHON, Steven B.: Targeting of Miz-1 is essential for Myc-mediated apoptosis. In: *J Biol Chem* 281 (2006), Nr. 6, S. 3283–3289. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M513038200>. – DOI 10.1074/jbc.M513038200. – ISSN 0021–9258 (Print)

[Payne u. Kemp 2005]

PAYNE, Shannon R. ; KEMP, Christopher J.: Tumor suppressor genetics. In: *Carcinogenesis* 26 (2005 Dec), Nr. 12, S. 2031–2045. <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgi223>. – DOI 10.1093/carcin/bgi223. – ISSN 0143–3334 (Print)

[Perera u. a. 2004]

PERERA, David ; PEREZ-HIDALGO, Livia ; MOENS, Peter B. ; REINI, Kaarina ; LAKIN, Nicholas ; SYVAOJA, Juhani E. ; SAN-SEGUNDO, Pedro A. ; FREIRE, Raimundo: TopBP1 and ATR colocalization at meiotic chromosomes: role of TopBP1/Cut5 in the meiotic recombination checkpoint. In: *Mol Biol Cell* 15 (2004), Nr. 4, S. 1568–1579. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E03-06-0444>. – DOI 10.1091/mbc.E03-06-0444. – ISSN 1059–1524 (Print)

[Peukert u. a. 1997]

PEUKERT, K. ; STALLER, P. ; SCHNEIDER, A. ; CARMICHAEL, G. ; HANEL, F. ; EILERS, M.: An alternative pathway for gene regulation by Myc. In: *Embo J* 16 (1997), Nr. 18, S. 5672–5686

[Pickart 2001]

PICKART, C. M.: Mechanisms underlying ubiquitination. In: *Annu Rev Biochem* 70 (2001), S. 503–33. – 0066-4154 Journal Article Review Review, Tutorial

[Popov u. a. 2007]

POPOV, Nikita ; WANZEL, Michael ; MADIREDO, Mandy ; ZHANG, Dong ; BEIJERSBERGEN, Roderick ; BERNARDS, Rene ; MOLL, Roland ; ELLEDGE, Stephen J. ; EILERS, Martin: The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability. In: *Nat Cell Biol* 9 (2007), Nr. 7, S. 765–774. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1601>. – DOI 10.1038/ncb1601. – ISSN 1465–7392 (Print)

[Rock u. a. 1994]

ROCK, K. L. ; GRAMM, C. ; ROTHSTEIN, L. ; CLARK, K. ; STEIN, R. ; DICK, L. ; HWANG, D. ; GOLDBERG, A. L.: Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. In: *Cell* 78 (1994), Nr. 5, S. 761–71. – 0092-8674 Journal Article

[Sambrook u. a. 1989]

SAMBROOK, J. ; FRITSCH, E.F. ; MANIATIS, T.: Molecular cloning: a laboratory manual. second. Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

[Sancar u. a. 2004]

SANCAR, Aziz ; LINDSEY-BOLTZ, Laura A. ; UNSAL-KACMAZ, Keziban ; LINN, Stuart: Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. In: *Annu Rev Biochem* 73 (2004), S. 39–85. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>. – DOI 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723. – ISSN 0066–4154 (Print)

[Scarafia u. a. 2000]

SCARAFIA, L. E. ; WINTER, A. ; SWINNEY, D. C.: Quantitative expression analysis of the cellular specificity of HECT-domain ubiquitin E3 ligases. In: *Physiol Genomics* 4 (2000), Nr. 2, S. 147–153. – 1531-2267 Journal Article

[Scheffner u. a. 1990]

SCHEFFNER, M. ; WERNES, B. A. ; HUIBREGTSE, J. M. ; LEVINE, A. J. ; HOWLEY, P. M.: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. In: *Cell* 63 (1990), Nr. 6, S. 1129–36. – 0092-8674 Journal Article

[Schnell u. Hicke 2003]

SCHNELL, Joshua D. ; HICKE, Linda: Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Nr. 38, S. 35857–35860. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R300018200>. – DOI 10.1074/jbc.R300018200. – ISSN 0021–9258 (Print)

[Schuhmacher u. a. 2001]

SCHUHMACHER, M. ; KOHLHUBER, F. ; HOLZEL, M. ; KAISER, C. ; BURTSCHER, H. ; JARSCH, M. ; BORNKAMM, G. W. ; LAUX, G. ; POLACK, A. ; WEIDLE, U. H. ; EICK, D.: The transcriptional program of a human B cell line in response to Myc. In: *Nucleic Acids Res* 29 (2001), Nr. 2, S. 397–406

[Schwarz u. a. 1998]

SCHWARZ, S. E. ; ROSA, J. L. ; SCHEFFNER, M.: Characterization of human hect domain family members and their interaction with UbcH5 and UbcH7. In: *J Biol Chem* 273 (1998), Nr. 20, S. 12148–54. – 0021-9258 Journal Article



[Sheiness u. a. 1978]

SHEINESS, D. ; FANSHIER, L. ; BISHOP, J. M.: Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. In: *J Virol* 28 (1978), Nr. 2, S. 600–10. – 0022-538x Journal Article

[Spector 1998]

SPECTOR, D L. (Hrsg.): *Cells: A Laboratory Manual*. 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998

[Staller u. a. 2001]

STALLER, P. ; PEUKERT, K. ; KIERMAIER, A. ; SEOANE, J. ; LUKAS, J. ; KARSUNKY, H. ; MOROY, T. ; BARTEK, J. ; MASSAGUE, J. ; HANEL, F. ; EILERS, M.: Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. In: *Nat Cell Biol* 3 (2001), Nr. 4, S. 392–9.

[Stone u. a. 1987]

STONE, J. ; LANGE, T. de ; RAMSAY, G. ; JAKOBOVITS, E. ; BISHOP, J.M. ; VARMUS, H. ; LEE, B.: Definition of regions in human c-myc that are involved in transformation and nuclear localization. In: *Mol. Cell. Biol.* 7 (1987), Nr. 5, S. 1697–1709

[Swaminathan u. a. 1997]

SWAMINATHAN, S ; KRANTZ, B A. ; WILKINSON, K D. ; HOCHSTRASSER, M: In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. In: *EMBO J* 16 (1997), Nr. 16, S. 4826–4838. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/16.16.4826>. – DOI 10.1093/emboj/16.16.4826. – ISSN 0261–4189 (Print)

[Tanaka 1995]

TANAKA, K.: Molecular biology of proteasomes. In: *Mol Biol Rep* 21 (1995), Nr. 1, 21–26. <http://www.hubmed.org/display.cgi?uids=7565659>

[Tommerup u. Vissing 1995]

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. In: *Genomics* 27 (1995), Nr. 2, S. 259–264

[Venkatachalam u. a. 1998]

VENKATACHALAM, S ; SHI, Y P. ; JONES, S N. ; VOGEL, H ; BRADLEY, A ; PINKEL, D ; DONEHOWER, L A.: Retention of wild-type p53 in tumors from

p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. In: *EMBO J* 17 (1998 Aug 17), Nr. 16, S. 4657–4667. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.16.4657>. – DOI 10.1093/emboj/17.16.4657. – ISSN 0261–4189 (Print)

[Vervoorts u. a. 2003]

VERVOORTS, J. ; LUSCHER-FIRZLAFF, J. M. ; ROTTMANN, S. ; LILISCHKIS, R. ; WALSEMANN, G. ; DOHMANN, K. ; AUSTEN, M. ; LUSCHER, B.: Stimulation of c-MYC transcriptional activity and acetylation by recruitment of the cofactor CBP. In: *EMBO Rep* 4 (2003), Nr. 5, S. 1–7. – 22575374 1469-221x Journal Article

[Vogelstein u. Kinzler 1993]

VOGELSTEIN, B ; KINZLER, K W.: The multistep nature of cancer. In: *Trends Genet* 9 (1993 Apr), Nr. 4, S. 138–141. – ISSN 0168–9525 (Print)

[Wagner u. a. 1992]

WAGNER, A J. ; LE BEAU, M M. ; DIAZ, M O. ; HAY, N: Expression, regulation, and chromosomal localization of the Max gene. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992), Apr, Nr. 7, S. 3111–3115. – ISSN 0027–8424 (Print)

[Wanzel u. a. 2004]

WANZEL, M. ; KLEINE-KOHLBRECHER, D. ; HEROLD, S. ; HOCK, A. ; BERNS, K. ; PARK, J. ; HEMMINGS, B. ; EILERS, M.: Akt and 14-3-3eta regulate Miz1 to control cell-cycle arrest after DNA damage. In: *Nat Cell Biol* (2004). – 1465-7392 Journal article

[Warr u. a. 2005]

WARR, Matthew R. ; ACOCA, Stephane ; LIU, Zhiqian ; GERMAIN, Marc ; WATSON, Mark ; BLANCHETTE, Mathieu ; WING, Simon S. ; SHORE, Gordon C.: BH3-ligand regulates access of MCL-1 to its E3 ligase. In: *FEBS Lett* 579 (2005), Nr. 25, S. 5603–5608. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.028>. – DOI 10.1016/j.febslet.2005.09.028. – ISSN 0014–5793 (Print)

[Weinstein u. Joe 2008]

WEINSTEIN, I B. ; JOE, Andrew: Oncogene addiction. In: *Cancer Res* 68 (2008), May, Nr. 9, S. 3077–80; discussion 3080. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3293>. – DOI 10.1158/0008–5472.CAN–07–3293

[Welcker u. a. 2004]

WELCKER, M. ; ORIAN, A. ; GRIM, J. A. ; EISENMAN, R. N. ; CLURMAN,

B. E.: A nucleolar isoform of the Fbw7 ubiquitin ligase regulates c-Myc and cell size. In: *Curr Biol* 14 (2004), Nr. 20, S. 1852–7. – 0960-9822 Journal Article

[Yada u. a. 2004]

YADA, M. ; HATAKEYAMA, S. ; KAMURA, T. ; NISHIYAMA, M. ; TSUNEMATSU, R. ; IMAKI, H. ; ISHIDA, N. ; OKUMURA, F. ; NAKAYAMA, K. ; NAKAYAMA, K. I.: Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. In: *Embo J* 23 (2004), Nr. 10, S. 2116–25. – 0261-4189 Journal Article

[Yamane u. a. 1997]

YAMANE, K ; KAWABATA, M ; TSURUO, T: A DNA-topoisomerase-II-binding protein with eight repeating regions similar to DNA-repair enzymes and to a cell-cycle regulator. In: *Eur J Biochem* 250 (1997), Nr. 3, S. 794–799. – ISSN 0014–2956 (Print)

[Yamane u. a. 2002]

YAMANE, K. ; WU, X. ; CHEN, J.: A DNA damage-regulated BRCT-containing protein, TopBP1, is required for cell survival. In: *Mol Cell Biol* 22 (2002), Nr. 2, S. 555–66.

[Yao u. Cohen 2002]

YAO, Tingting ; COHEN, Robert E.: A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. In: *Nature* 419 (2002), Nr. 6905, S. 403–407. <http://dx.doi.org/10.1038/nature01071>. – DOI 10.1038/nature01071. – ISSN 0028–0836 (Print)

[Zhao u. a. 2008]

ZHAO, X ; HENG, JI ; GUARDAVACCARO, D ; JIANG, R ; PAGANO, M ; GUILLEMOT, F ; IAVARONE, A ; LASORELLA, A: The HECT-domain ubiquitin ligase Huwe1 controls neural differentiation and proliferation by destabilizing the N-Myc oncoprotein. In: *Nat Cell Biol* (2008). <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1727>. – DOI 10.1038/ncb1727. – ISSN 1476–4679 (Electronic)

[Zhong u. a. 2005]

ZHONG, Qing ; GAO, Wenhua ; DU, Fenghe ; WANG, Xiaodong: Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. In: *Cell* 121 (2005), Nr. 7, S. 1085–1095. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.06.009>. – DOI 10.1016/j.cell.2005.06.009. – ISSN 0092–8674 (Print)

[Ziegelbauer u. a. 2001]

ZIEGELBAUER, J. ; SHAN, B. ; YAGER, D. ; LARABELL, C. ; HOFFMANN, B. ;  
TJIAN, R.: Transcription factor MIZ-1 is regulated via microtubule association.  
In: *Mol Cell* 8 (2001), Nr. 2, S. 339–49.