

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. R. Müller



**Identifizierung von Inhibitoren der Wachstumsarrest
induzierenden Funktion von Miz1
und
Charakterisierung von 14.3.3eta als Inhibitor der Funktion von
Miz-1**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt

von

Daniela Kleine-Kohlbrecher

geb. 11.07.1975 Georgsmarienhütte

Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 11.09. 2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereich

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. M. Eilers

Korreferent: Prof. Dr. H.P. Elsässer

<i>1 Einleitung</i>	<i>1</i>
1.1 Das Konzept der Onkogene und Krebsentstehung	1
1.1.1 Onkogene	2
1.1.2 Tumorsuppressoren	4
1.2 Der Transkriptionsfaktor Miz1	7
1.2.1 Allgemeine Eigenschaften von Miz1	7
1.2.2 Genregulation durch Miz1	9
1.3 Die Myc-Miz1 Interaktion in ihrer physiologischen Relevanz	12
1.3.1 Interferenz mit der TGF- β Signaltransduktionskaskade	12
1.3.2 Interferenz mit der Wnt-Signaltransduktionskaskade	14
1.3.3 Interferenz mit zellulärer Differenzierung im hämatopoetischen System	16
1.3.4 Miz in der Regulation der zellulären Homöostase	18
1.4 Biologische Relevanz der Genaktivierung durch Miz1	18
1.4.1 Miz1 in der Embryogenese und Differenzierung	18
1.4.2 Miz1 in der DNA-Schadensantwort	20
1.5 Interaktionspartner von Miz1	23
1.5.1 Interaktion von Miz1 mit dem Tumorsuppressor ECRG1	23
1.5.2 Miz1 und HCF-1	24
1.6 Zielsetzung der Arbeit	25
<i>2 Material</i>	<i>27</i>
2.1 Stämme und Zelllinien	27
2.1.1 Bakterienstämme	27
2.1.2 Säugerzellen	27
2.2 Medien	28
2.2.1 Medien für die Bakterienkultur	28
2.2.2 Medien für die Zellkultur	28
2.3 Synthetische Oligonukleotide	29
2.3.1 Primer für die RT-PCR	29
2.3.2 Primer für die Klonierung	30
2.3.3 Primer für die in vitro Mutagenese von Miz1	30
2.3.4 Oligonukleotide für Oligonukleotid-Pulldown	31
2.4 Plasmide	32
2.4.1 Grundvektoren	32
2.4.2 Expressionsplasmide	33
2.4.2.1 Expressionsvektoren für Punktmutanten von Miz1	34
2.4.3 Expressionsplasmide zur Erzeugung rekombinanter Retroviren	35
2.4.4 Reporterplasmide	36

2.5 Retrovirale cDNA-Expressionsbibliothek	36
2.6 Lösungen	37
2.6.1 Lösungen für die Zellkultur	37
2.6.2 Allgemeine Lösungen	37
2.7 Puffer	39
2.8 Chemikalien	42
2.9 Standards und Enzyme	43
2.9.1 Standards	43
2.9.2 DNA modifizierende Enzyme	44
2.9.3 RNA und DNA verdauende Enzyme	44
2.9.4 Polymerasen und Reverse Transkriptasen	44
2.10 Filme, Filter und Geräte	44
2.11 Antikörper	45
2.11.1 Primäre Antikörper	45
2.11.2 Sekundäre Antikörper	46
2.12 Kit-Systeme	46
<i>3 Methoden</i>	<i>47</i>
3.1 Zellkultur	47
3.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen	47
3.1.2 Passagieren von Zellen	47
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl	47
3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	47
3.1.5 Wachstumskurven	48
3.2 Zellbiologische Methoden	48
3.2.1 Transfektion von Säugerzellen	48
3.2.1.1 Transiente Transfektion durch Kalziumphosphatpräzipitation	48
3.2.1.2 Transiente Transfektion für Reporter-Assays	49
3.2.1.3 Bestimmung der Luziferaseaktivität	49
3.2.1.4 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität	49
3.2.2 Retrovirale Infektion zur Integration von Plasmid-DNA	50
3.2.2.1 Herstellung rekombinanter Retroviren	50
3.2.2.2 Infektion von Zellen mit rekombinanten Retroviren	51
3.2.3 Selektion Antibiotikum-resistenter Zellen	51
3.2.4 Koloniebildung	51
3.2.5 Hormoninduktion der Akt-ER Chimäre	52
3.2.6 Behandlung von Zellen mit verschiedenen Kinaseinhibitoren	52
3.2.7 Radioaktive Markierung von Phospho-Proteinen mit ^{32}P <i>in vivo</i>	53
3.3 Retroviraler Screen einer humanen cDNA-Expressionsbibliothek	53
3.3.1 Primärer Screen	53

Inhaltsverzeichnis

3.3.1.1	Aufbereitung der cDNA Expressionbibliothek	53
3.3.1.2	Amplifikation der Expressionsbibliothek in Bakterien	54
3.3.1.3	Infektion von Zellen mit cDNA Expressionsbibliothek-Retroviren	54
3.3.1.4	Superinfektion von cDNA exprimierenden Zellen	54
3.3.2	Sekundärer Screen	55
3.3.2.1	Herstellung Replikations-kompetenter MoMuLV-Viren	55
3.3.2.2	Mobilisierung retroviral infizierter cDNA-Sequenzen mit MoMuLV	55
3.4	Proteinchemische Methoden	56
3.4.1	Herstellung von Proteinlysaten	56
3.4.1.1	Herstellung von Proteinlysaten durch Ultraschallbehandlung	56
3.4.1.2	Herstellung von Proteinlysaten mittels Gefrier-Auftau Technik	56
3.4.2	Proteinbestimmung nach Bradford	57
3.4.3	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
3.4.4	Analyse von Proteinen durch Western-Blot	57
3.4.4.1	Semidryblot	57
3.4.4.2	Tankblot	58
3.4.5	Immundetektion von spezifischen Proteinen	58
3.4.6	Immunpräzipitation	59
3.4.7	Bakterielle Expression von rekombinanten Proteinen und deren Aufreinigung	59
3.4.8	indirekte Immunfluoreszenz	60
3.5	Molekularbiologische Methoden	61
3.5.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden	61
3.5.1.1	Transformation von Bakterien durch Hitzeschock	61
3.5.1.2	Analytische Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	61
3.5.1.3	Aufreinigung von DNA durch Phenolextraktion	62
3.5.2	Isolierung von RNA	62
3.5.3	Northern Blot	62
3.5.3.1	Elektrophorese von RNA	62
3.5.3.2	Kapillartransfer auf eine Nylonmembran	63
3.5.3.3	Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Proben	63
3.5.4	Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	64
3.5.5	<i>In vitro</i> Mutagenese	65
3.6	Analyse von Protein/DNA Komplexen	65
3.6.1	Oligonukleotid-Pulldown von DNA bindenden Proteinen	65
3.6.1.1	Hybridisierung der biotynilierten Oligonukleotide	65
3.6.1.2	Äquilibrierung der Streptavidin-Agarose	66
3.6.1.3	Herstellung der Gesamt-Proteinlysate	66
3.6.1.4	Vorreinigung der Proteinlysate	66
3.6.1.5	Oligonukleotid-Pulldown	66

4 Ergebnisse	68
4.1 Retroviraler Screen einer cDNA-Expressionsbibliothek zur Identifizierung neuer Inhibitoren des Miz1 vermittelten Wachstumsarrestes	67
4.1.1 Phänotypische Identifizierung von Inhibitoren der wachstumshemmenden Funktion von Miz1	67
4.1.2 Funktionale Analyse der cDNA-Insertionen aus den erhaltenen Zellklonen	69
4.1.3 Genotypische Analyse der potentiellen Inhibitoren des Miz1 induzierten Wachstumsarrestes	74
4.1.4 Überprüfung der Klone auf Expression von Miz1	78
4.2 Funktionale Analyse von 14-3-3eta als negativer Regulator der wachstumsinhibierenden Funktion des Transkriptionsfaktors Miz1	82
4.2.1 Isolation von 14-3-3eta als Inhibitor der Miz1 Funktion	82
4.2.2 14-3-3eta hemmt den Miz1 induzierten Wachstumsarrest in der G1-Phase	82
4.2.3 14-3-3eta zeigt eine reprimierende Wirkung auf die Miz1 vermittelte Transkription von Miz1	84
4.2.4 Endogenes Miz1 assoziiert mit 14-3-3 Proteinen	87
4.2.5 14-3-3eta verhindert die Bindung von Miz1 an die DNA	91
4.2.6 Die Serin-Threonin Kinase Akt phosphoryliert Miz1 an Serin 428 <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	93
4.2.7 Die Interaktion von 14-3-3eta und Miz1 ist abhängig von der Phosphorylierung durch Akt <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	100
5 Diskussion	101
5.1 Screening-Verfahren als Methode zur Identifizierung neuer Interaktionspartner	101
5.1.1 Identifizierung von Inhibitoren der Wachstumsarrest induzierenden Funktion Miz1	101
5.2 14-3-3eta interagiert mit Miz1	106
5.2.1 Biologie der 14-3-3 Proteinfamilie	106
5.2.1.1 Die biologische Rolle der 14-3-3 Proteine	108
5.2.2 Inhibierende Wirkung von 14-3-3eta auf Miz1	111
5.2.3 Akt und 14-3-3eta kooperieren in der Hemmung der Miz1-abhängigen Transaktivierungsaktivität	114
5.2.4 Biologische Relevanz der 14-3-3/ Miz1 Interaktion	117
6 Zusammenfassung	123
6.1 deutsche Zusammenfassung	123
6.2 English summary	125
7 Literaturverzeichnis	127

8 Anhang	138
8.1 Abkürzungen	138
8.2 Lebenslauf	143
8.3 Akademische Lehrer	145
8.4 Danksagung	146
8.5 Ehrenwörtliche Erklärung	148

1. Einleitung

1.1 Das Konzept der Onkogene und Krebsentstehung

Mit dem Begriff Krebs werden bösartige Tumore beschrieben. Das Wort Tumor bedeutet übersetzt "Verhärtung" und deswegen wird der Begriff Tumor für alle Verhärtungen verwendet, auch solche, die mit Krebs nichts zu tun haben. Gutartige (benigne) Neubildungen bestehen aus Zellen, die den normalen Zellen ähneln und nicht streuen (metastasieren). Bösartige (maligne) Tumoren hingegen durchdringen das umgebende Gewebe, streuen in den Körper und erzeugen damit Tochtergeschwülste (Metastasen).

Krebs ist im allgemeinen Sprachgebrauch ein Sammelbegriff für eine Vielzahl verwandter Krankheiten, bei denen Körperzellen unkontrolliert wachsen, sich teilen und gesundes Gewebe verdrängen und zerstören können. Krebs hat unterschiedliche Auslöser, die letztlich alle zu einer Störung des genetisch geregelten Gleichgewichts zwischen Zellzyklus (Wachstum und Teilung) und Zelltod (Apoptose) führen. Wie gefährlich ein Krebs ist und wie aggressiv gegen die Krankheit vorgegangen werden muß, hängt von der Art und auch der Lage des Tumors

Trotz der Verschiedenartigkeit der Tumoren scheinen sie durch die gleichen grundlegenden Prozesse zu entstehen. Die Zellen eines gesunden Körpers leben in einer komplexen Gemeinschaft. Sie sind voneinander abhängig, beeinflussen und kontrollieren sich gegenseitig in ihrem Wachstum. Dadurch wird die angemessene Ausdehnung und Architektur von Geweben bewahrt. Krebszellen durchbrechen diese Kontrollen, entziehen sich den Wachstumsbeschränkungen und folgen ihrem eigenen Vermehrungsprogramm. Sie können sich aus dem Zellverband lösen und an anderen Stellen im Körper neue Tumoren hervorbringen (Metastasierung).

Jede Krebserkrankung beruht auf Mutationen der wachstumsregulierenden Gene einer Zelle, die in den meisten Fällen im Laufe des Lebens erworben werden. Veränderungen in weiteren Klassen von Genen, die nicht das Wachstum regulieren, können jedoch ebenfalls zur malignen Entartung von Zellen beitragen. Derartige Läsionen entstehen oft als Folge von Schäden bei intrazellulären Stoffwechselprozessen oder durch exogene Faktoren wie Virusinfektionen oder chemische Noxen. Die DNA Reparatursysteme der Zelle beheben die meisten dieser Schädigungen, die nicht behobenen Schädigungen führen zu Veränderungen des genetischen Programms einer Zelle. Das Konzept der Tumorentstehung auf der

Grundlage von Störungen des genetischen Programms wurde bereits Anfang des 20. Jahrhunderts von T. Boveri in seiner Arbeit „Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren“ (Boveri, 1914) beschrieben. Er postuliert darin, daß Krebszellen Veränderungen in ihrem Chromosomenbestand aufweisen, die für jeden Tumortyp charakteristisch sind. Bemerkenswert ist, daß Boveri seine Erkenntnisse aus der histologischen Beobachtung eines einfachen Modellsystems entwickelte, den Teilungsvorgängen bei Seeigeleiern. Auch heute stellen Tiermodelle eine unverzichtbare Komponente der biomedizinischen Forschung dar. Vergleiche genetischer und molekularbiologischer Daten des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* oder der Taufliege *Drosophila melanogaster* halfen bei der Aufklärung von Genfunktionen beim Menschen.

Die Überlegungen von Boveri blieben zunächst unbeachtet bis zellbiologische und molekulargenetische Methoden diese Gedanken bestätigten.

Die erste tumorspezifische Chromosomenaberration die beim Menschen entdeckt wurde, war das Philadelphia Chromosom bei der Chronisch Myeloiden Leukämie (CML; Nowell & Hungerford, 1960). Es resultiert aus einer Translokation der Chromosomen 9 und 22 (Rowley, 1973). Ende der siebziger Jahre gelang es die ersten Gene zu klonieren, die an Prozessen der Karzinogenese beteiligt sind. Diese Gene, die zusammen nur einen kleinen Teil der genetischen Ausstattung einer Zelle ausmachen, lassen sich in zwei Klassen unterteilen: Proto-Onkogene (Krebsgenvorläufer) und Tumorsuppressor-Gene (tumorunterdrückende Gene). In ihrer normalen Form dirigieren sie den Lebenszyklus einer Zelle, indem sie die genaue Abfolge von Prozessen der Zellteilung und des Zellwachstums regulieren. Allgemein gesagt werden das Zellwachstum, die Zellteilung und die Zelldifferenzierung durch Proto-Onkogene gefördert und durch Tumorsuppressor-Gene gehemmt.

1.1.1 Onkogene

Onkogene (griech.: *onkos* Tumor) sind Gene, die an der Entstehung von Krebs beteiligt sind. Sie sind durch Mutationen und Fehlregulationen aktiv an der malignen Transformation von Zellen beteiligt. Die Onkogene wurden zuerst in Retroviren gefunden. Bestimmte Retroviren weisen Sequenzen auf, die ihnen die Fähigkeit verleihen Tumorwachstum auszulösen, und deshalb als virale Onkogene (v-onc)

bezeichnet werden. Später stellte sich heraus, daß diese Gene nicht viralen Ursprungs sind. Es handelt sich um zelluläre Sequenzen die vom Wirtsgenom strukturell verändert in das nicht tumorigene Retrovirusgenom übertragen wurden (Stehelin *et al.* 1976). Da die meisten dieser Gene an der Tumorigenese beteiligt sind, wurde in den folgenden Jahren nachgewiesen.

Als Proto-Onkogen wird die nichtmutierte Form eines Onkogens bezeichnet. Mutieren diese Proto-Onkogene, kommt es zur Synthese von strukturell veränderten Proteinen, sowie zu einer Überproduktion des Genproduktes. Aus dem Proto-Onkogen ist dann ein krebsbegünstigendes Onkogen geworden, daß die Zelle zu einer übermäßigen Vermehrung anregt. Es gibt verschiedene Mechanismen, die ein Proto-Onkogen in ein Tumorgen umwandeln können. Diese Mechanismen können in zwei Kategorien eingeteilt werden. Zum einen können strukturelle Defekte wie Punktmutationen oder Genrekombinationen als Folge chromosomaler Translokationen erfolgen, die ein Genprodukt mit veränderten biologischen Eigenschaften entstehen lassen. Zum anderen kann die Häufigkeit der Synthese eines Genprodukts verändert sein. Diese Veränderungen treten unter anderem nach chromosomalen Translokationen auf, wie zum Beispiel der t(8;14) Translokation bei Burkitt Lymphomen (Haluska *et al.*, 1988). Hierbei werden Regulatorsequenzen des Immunglobulingenlokus in den Lokus des Myc-Gens überführt und erhöhen die Myc Expression. Andere Ursachen für eine Überexpression von Onkogenen sind Genamplifikationen oder fehlregulierte epigenetische Prozesse.

Es wurden insgesamt ungefähr 60 verschiedene Onkogene entdeckt, die für Proteine mit unterschiedlichen Funktionen in der Zelle kodieren. Sie können Wachstumsfaktoren oder Wachstumsfaktor spezifische Rezeptoren hervorbringen. Mutationen in diesen Proteinklassen können wichtige Signalübertragungssysteme permanent aktivieren, so daß diese auch dann wachstumstimulierende Signale übermitteln, wenn keines gegeben wurde. Die entsprechenden Zellen entziehen sich der Vermehrungskontrolle. Ein Beispiel für solch einen Wachstumsfaktorrezeptor ist ERB-B2 (HER-2/neu) der an der Entstehung von Brustkrebs beteiligt ist (Slamon *et al.*, 1987). Andere Onkogene werden in der Familie der GTP-bindenden Proteine gefunden, die Signalmediatoren zwischen der Zellmembran und dem Zytoplasma darstellen. Das bestuntersuchte Beispiel hierfür liefert die Familie der Ras-Onkogene (Weinberg, 1984). Normale Ras-Proteine nehmen stimulatorische Signale von den

Rezeptoren auf und leiten sie an nachgeschaltete Proteine weiter. Mutationen in den Ras-Genen führen zu konstitutiv aktivierten Ras Protein-Isoformen. Diese hyperaktiven Ras-Proteine kommen in einem Viertel aller humanen Tumoren vor (Bos, 1989). Eine weitere Klasse von Onkogenen ändert die Aktivität von Transkriptionsfaktoren im Zellkern. Ein Beispiel hierfür ist die Familie der *MYC*-Gene. Die Myc-Expression wird normalerweise von Wachstumsfaktoren veranlaßt (Keath *et al.*, 1984). Bei vielen Krebserkrankungen, insbesondere bei malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, sind die Myc-Spiegel in der Zelle unphysiologisch erhöht auch in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren (Adams *et al.*, 1985; Erikson *et al.*, 1986).

Onkogene werden auch in der Klasse von antiapoptotischen Faktoren gefunden. Das Bcl-2 Protein repräsentiert einen solchen Faktor (Yang und Korsmeyer, 1996). Die Überexpression von Bcl-2 verhindert den programmierten Zelltod (Apoptose) von Zellen, der gewissermaßen ein „Selbstmordprogramm“ darstellt. Die verlängerte Lebenszeit erhöht in diesen Zellen das Risiko weitere genetische Läsionen anzuhäufen, die dann zu malignen Transformation der Zellen führen können.

1.1.2 Tumorsuppressoren

Die Tumorinduktion ist jedoch ein komplexes Geschehen, an dem Mutationen in zwei verschiedenen Gen-Klassen beteiligt sind. Zum einen führt die Aktivierung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen zu einer vermehrten Zellteilung, zu unkontrolliertem Wachstum und Inhibition von Differenzierungsprozessen. Zum anderen bewirkt die Inaktivierung von Tumorsuppressorgen das Ausschalten wichtiger Kontrollpunkte des Zellzyklus, des Zellwachstums und der Zellproliferation. Die zeitliche Regulation der zellulären Proliferations-, Wachstums- oder Differenzierungsprozesse geht verloren. Wie bei der Aktivierung von Onkogenen ist auch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgen in der Regel Folge von Mutationen als Ergebnis vielfältiger endogener oder exogener DNA-Schädigungen. Es gibt jedoch einen wichtigen Unterschied. Die Aktivierung eines Proto-Onkogens stellt einen Funktionsgewinn dar und daher genügt schon die Mutation eines Allels, um eine onkogene Wirkung, z.B. die Beschleunigung der Zellproliferation, zu erreichen. Anders ist es bei den Tumorsuppressorgen. Wird bei diesen ein Allel ausgeschaltet, so bleibt das zweite

Allel aktiv. Die funktionelle Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens setzt somit voraus, daß beide Allele des Gens mutiert sind (Knudson *et al.*, 1971, Comings *et al.*, 1973). Allerdings wird nicht in allen Fällen immer eine Störung beider Allele beobachtet. Bei einigen Tumorsuppressoren reicht eine Funktionsbeeinträchtigung durch eine verminderte Genexpression unter einen kritischen Schwellenwert aus, um zu einer malignen Transformation beizutragen (Yan *et al.*, 2000). Diese Störung wird Haploinsuffizienz genannt und ist für die Proteinphosphatase Pten beschrieben, die für die adäquate Regulation des Akt-Signalweges notwendig ist (Kwabi-Addo *et al.*, 2001).

Tumorsuppressorgene werden auch als rezessive Tumorgene bezeichnet. Erblisch bedingte Tumordispositionen die durch Mutationen von Tumorsuppressorgenen in der Keimbahn entstehen, folgen wie beim Retinoblastom einem autosomal-dominantem Erbgang. Der Grund dafür ist, daß der Anlageträger ein hohes Risiko trägt auch das zweite Allel im Laufe seines Lebens zu verlieren, wodurch maligne Transformation erfolgen können. Tumorsuppressorgene werden als Antagonisten der Onkogene angesehen und über den Verlust ihrer Funktion („loss of function“) definiert (Comings, 1973). Ein solcher Verlust kann auf einer Deletion oder Mutation im kodierenden Bereich des Gens oder seiner Regulatorsequenzen beruhen. Dieses kann zu einem Expressionsverlust oder einer strukturellen Veränderung des Tumorsuppressorproteins führen. Das Genprodukt des mutierten Allels kann aber auch mit dem Genprodukt des intakten Allels und dessen Funktion hemmen (dominant-negativer-Effekt). Auch epigenetische Fehlregulationen wie Hypermethylierungen können einen Aktivitätsverlust des Tumorsuppressorgens nach sich ziehen. Die Funktion von Tumorsuppressoren kann auch durch einen gesteigerten Proteinabbau inhibiert werden. Ein Beispiel hierfür ist die durch eine Amplifikation des Mdm2-Gens entstehende Überexpression des Mdm2-Proteins, was einen verstärkten Abbau des Tumorsuppressors p53 bewirkt (Oliner *et al.*, 1992).

Einen weiteren wichtigen Inhibitionsmechanismus von Tumorsuppressoren stellt die Onkogenexpression von DNA-Viren dar. Anders als bei den in Retroviren identifizierten Onkogenen gibt es bei den DNA-Viren identifizierten Onkogenen kein zelluläres Gegenstück. Die viralen Proteine blockieren wichtige Tumorsuppressorproteine und dadurch interferieren sie mit zellulären Kontrollmechanismen der DNA Replikation. Für die Papillomaviren Typ 16 und 18 wurde gezeigt, daß sie eine kausale

Rolle in der Tumorentstehung spielen. Das virale E6 Protein des Typ 18 bindet beispielsweise an den Tumorsuppressor p53 und stimuliert dadurch dessen Ubiquitinierung und die daraus folgende Degradation (Gu *et al.*, 1995).

Wie die Onkogene finden sich auch die Tumorsuppressoren in verschiedenen zellulären Funktionsklassen. Sie modulieren auf verschiedenen Ebenen die komplexen Signaltransduktionskaskaden einer Zelle. Proteinphosphatasen wie Pten fungieren als Gegenspieler der PI3Kinase/Akt Signalkaskade, GTPase stimulierende Proteine wie NF1 (Neurofibromin 1) inaktivieren die Ras-vermittelten Signalwege und Inhibitoren der zyklinabhängigen Kinasen wie p15^{Ink4b}, p16^{Ink4a} und p14^{Arf} hemmen den Zellzyklus. Andere Tumorsuppressoren wie das Retinoblastoma Protein (Rb) oder p53 reprimieren die Expression von Genen die für den Übergang in die S-Phase des Zellzyklus essentiell sind und blockieren so die Zellproliferation.

Nach Kinzler und Vogelstein (1997) gibt es noch eine andere Art der Einteilung von Tumorsuppressoren nach Pfortnern („Gatekeeper“) und Hausmeistern („Caretakern“). Die als „Gatekeeper“ bezeichneten Gene sind Tumorsuppressoren deren Inaktivierung direkt das Wachstum eines Tumors reguliert und zu einer Verbreitung des Krebses in einem bestimmten Gewebe führt. So bewirken erbliche Mutationen bestimmter Krankheiten Tumorentwicklungen in bestimmten Geweben. Beispiele für solche erblichen Tumorerkrankungen sind das von Hippel Lindau Syndrom, das Tumoren vorwiegend in der Retina und im Kleinhirn auslöst, und die Neurofibromatose Typ 1, die zu Tumoren der Schwannschen Zellen des peripheren Nervensystems führt. Der Ausbruch dieser Tumorerkrankungen unterliegt dem sogenannten Prinzip der zwei Störungen („two Hit Hypothesis“), wobei der erbliche Verlust eines Allels in der Keimbahn zunächst die Empfindlichkeit für eine Tumorerkrankung erhöht und der spätere somatische Verlust des zweiten Allels das Tumorstadium auslöst.

Die Inaktivierung eines Hausmeisters („Caretaker“) dagegen bewirkt nur indirekt das Tumorstadium durch die Verursachung genomischer Instabilität. Dadurch werden Mutationen anderer Gene wie zum Beispiel der Pfortner-Gene („Gatekeeper“) beschleunigt. Hausmeister-Gene („Caretaker“) sind vertreten in der Gruppe von Genen, die beispielsweise für die Ausbildung der Erkrankungen Xeroderma Pigmentosum und Ataxia-Teleangiectasia verantwortlich sind. Der Verlust eines

Hausmeister-Gens reicht alleine nicht aus, um eine Tumorerkrankung auszulösen. Dazu wird zusätzlich der biallelische Verlust eines Pfortner-Gens benötigt.

1.2 Der Transkriptionsfaktor Miz1

1.2.1 Allgemeine Eigenschaften von Miz1

In einem Hefe-Zweihybrid-System wurde ein Protein als Interaktionspartner des Onkoproteins Myc identifiziert, welches als Miz1 (*Myc-interacting zincfinger protein 1*) bezeichnet wurde. Miz1 assoziiert mit dem Carboxy-Terminus von c-Myc und N-Myc, interagiert aber nicht mit MAD oder USF, zwei Myc verwandten Helix-Loop-Helix Proteinen (Peukert *et al.*, 1997). In der Maus wurde eine eng verwandte cDNA gefunden, die über ihre gesamte Länge eine 92%ige Homologie zu dem humanen Miz1 kodierenden Gen aufweist (Schulze *et al.* 1995). Das Miz1 Gen kodiert für ein 803 Aminosäuren großes Polypeptid mit einem berechneten Molekulargewicht von ungefähr 88 kDa (Peukert *et al.* 1997). Die Proteinstruktur besitzt am Aminoterminus eine POZ-Domäne (*P*oxvirus und *Z*incfinger) die auch BTB-Domäne (Bric à brac, Tramtrack, Broad Complex; Bardwell und Treisman, 1994) genannt wird. Im carboxyterminalen Bereich des Miz1 Proteins befinden sich dreizehn Zinkfinger (Peukert *et al.* 1997).

Das 120 Aminosäuren umfassende, hochkonservierte POZ-Motif stellt eine Protein/Protein-Interaktionsdomäne mit einem hydrophoben Charakter dar, welcher durch 37 konservierte Aminosäuren bestimmt wird. Röntgenstrukturanalysen des PLZF-Proteins (*P*romyelocytic *L*eucemia *Z*incfinger protein) zeigten, daß die dreidimensionale Struktur der POZ-Domänen aus einem zentralen Gerüst von α -Helices besteht, das von β -Faltblättern flankiert ist (Ahmad *et al.* 1998). Diese häufig in Proteinen vorkommende Domäne vermittelt neben Proteininteraktionen auch die Ausbildung von Homodimeren (Bardwell und Treisman, 1994, Dhordain *et al.* 1995). Kristallstrukturanalysen der POZ-Domäne des Miz1 Proteins zeigen eine tetramere Organisation. Das Homotetramer der Miz1-POZ Domäne läßt erkennen, daß die Untereinheiten über zwei Arten von Interaktionsflächen dimerisieren können. Zum einen können zwei POZ-Domänen über die alpha Helices interagieren und ein Homodimer ausbilden, was bereits für POZ-Domänen beschrieben war. Zum anderen

können die POZ-Domänen Homodimere über die β -Faltblätter interagieren, worüber die Dimere mit einander verbunden werden und ein Homotetramer ausbilden (Stead *et al.* 2007).

Die dreizehn Zinkfinger-Motife entsprechen dem C2H2-Typ (Peukert *et al.* 1997). Die ersten zwölf Zinkfinger liegen als direkt aufeinanderfolgende Tandemwiederholungen vor. Der dreizehnte Zinkfinger ist durch eine achtzig Aminosäuren umfassende Sequenz carboxyterminal von den anderen getrennt. Dieses Sequenzstück ist zwar in homologen cDNAs des Menschen, der Maus und des Huhns konserviert, besitzt jedoch keinerlei Homologie zu einer Zinkfingersequenz. Funktionell ist diese Region durch die Ausbildung α -helikale Struktur für die Bindung zwischen Myc und Miz1 verantwortlich.

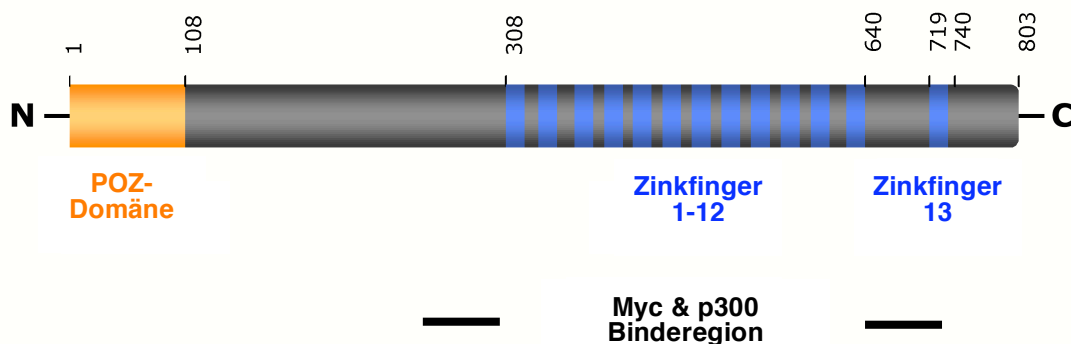


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Miz1 proteins (Myc-interacting-zincfinger 1). Das 803 Aminosäuren umfassende Polypeptid besteht aus einer N-terminalen Proteininteraktionsdomäne POZ (Poxvirus und Zinkfinger; orange) und 13 Zinkfingern des Cys2-His2 Typs (blau). Die schwarzen Querbalcken geben den Bereich der Myc und p300 Interaktion mit dem Miz1 Protein an.

Im Gegensatz zu anderen bekannten POZ-Domänen enthaltenden Proteinen, die als schwerlösliche Aggregate im Nukleoplasma des Zellkerns vorliegen (Bardwell und Treisman, 1994), ist Miz1 auch als lösliches Protein im Zytoplasma lokalisiert und dort an Mikrotubuli assoziiert (Peukert *et al.* 1997, Ziegelbauer *et al.* 2001). Diese Interaktion ist von einer Region zwischen dem siebten und elften Zinkfinger abhängig. Die Zerstörung des Mikrotubuligerüsts durch Mikrotubuli destabilisierende Agenzien wie Colchicin fördert die nucleäre Lokalisierung von Miz1 (Ziegelbauer *et al.* 2001).

Die Komplexierung mit Myc verändert die physikalischen Eigenschaften des Miz1 Proteins, so daß es im Zellkern in unlöslichen Aggregaten vorkommt.

Lokalisierungsstudien haben gezeigt, daß Miz1, das kein eigenes Kernlokalisierungssignal aufweist, über Myc koimportiert wird. Miz1 Mutanten, denen die POZ-Domäne fehlt sind weitgehend unbeeinflußt von Myc (Peukert *et al.* 1997).

Das Miz1 kodierende Gen liegt auf Chromosom 1 in der Region 1p36.1 bis 1p36.2 (Tommerup und Vissing, 1995). 19-36% aller primären Neuroblastom-Tumore weisen einen monoallelischen Verlust genetischen Materials in dieser Region auf (Brodeur *et al.*, 1977, Fong *et al.*, 1989). Es wird vermutet, daß in diesen Verlustbereichen verschiedene Tumorsuppressorgene liegen (Caron *et al.*, 1993; Takeda *et al.*, 1994). Diese Vermutung wurde durch die Beobachtung unterstützt, daß der Transfer eines intakten Chromosom 1 mit einer Deletion im Bereich -1p in eine Neuroblastomzelllinie Differenzierungsprozesse und Apoptose induziert (Bader *et al.*, 1991). Neuere Studien an Neuroblastomen ergaben, daß eine erhöhte Expression von Miz1 das Wachstum von Neuroblastomzellen hemmt und assoziiert ist mit einer guten Ausgangsprognose der Neuroblastome. Analysen mehrerer Neuroblastomzelllinien mit niedriger oder fehlender Expression von Miz1 ergaben, daß Miz1 in diesen Zelllinien nicht mutiert ist. Eine Deletion beider Allele des Miz1 Gens ist lethal für die Zellen (Adhikari *et al.* 2003). In der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y ist die niedrige Miz1 Expression vielmehr auf eine epigenetische Geninaktivierung beider Miz1 Allele zurück zu führen. Dahingegen scheint es sich bei den beiden Neuroblastomzelllinien CHP134 und IMR5 um eine Kombination aus dem chromosomalen Verlust des einen Allels und der epigenetischen Inaktivierung des anderen Allels zu handeln. In beiden Fällen ist die Expression von Miz1 soweit reduziert, das sie das Wachstum der Neuroblastomzellen nicht länger unterdrücken kann (Ikegaki *et al.*, 2007).

1.2.2 Genregulation durch Miz1

Die meisten POZ/BTB-Domänen enthaltenen Zinkfingerproteine fungieren als transkriptionelle Repressoren, wie es beispielsweise für LAZ3/BCL6 gezeigt wurde (Deweindt *et al.*, 1995). Miz1 bildet genauso wie das Protein ZF5, welches an den Promotor des murinen c-Myc Gens und den HIV-1 LTR Promoter bindet, eine Ausnahme (Kaplan und Calame, 1997). Miz1 bindet an sogenannte Initiator-Elemente. Dabei handelt es sich um schwache Konsensussequenzen, die häufig in

TATA-Box tragenden Promotoren von Säugetiergenen die Sequenz 5'PyPyCAPyPyPyPyPy3' aufweisen (Py= Pyrimidinbase, C= Cytosin, A= Adenosin). Die Initiatorelemente bewirken die korrekte Initiation der Transkription und liegen in unmittelbarer Nähe der transkriptionellen Startpunkte von verschiedenen, von der RNA Polymerase II abhängigen Promotoren (Corden *et al.* 1980; Smale & Baltimore, 1989). Sie wurden erstmals für das Deoxynucleotidyltransferase-Gen nachgewiesen. Der Promoterbereich dieses Gens besitzt keine TATA-Box dafür aber ein 17 Basenpaar langes Element, das für eine korrekte Transkription ausreicht. Das Motif beinhaltet die Transkriptionsstartstelle (Smale & Baltimore, 1989). Das Miz1 bei der Transkriptionsaktivierung die Bindung an das Initiator Element benötigt, zeigten Reporterstudien mit dem p15^{Ink4b} Promoter, bei dem das Initiatorelements gegen eine TATA-Box ausgetauscht wurde. der Austausch des Initiatorelements hatten zur Folge, daß Miz1 die Transkription nicht mehr aktivieren konnte (Staller *et al.*, 2001). Miz1 bindet demzufolge sequenzspezifisch an die Initiatorelemente der Zielgenpromotoren.

Die Erkennungssequenz der durch Miz1 gebundenen Promotoren ist nicht stark konserviert. Aber ähnlich wie das Zinkfingerprotein CTCF1, kann auch Miz1 durch Einsatz unterschiedlicher Anteile seiner Zinkfinger DNA Bereiche mit variabler Basenkombination erkennen. Der elf Zinkfinger umfassende CCCTC-Bindefaktor 1 (CTCF1) wurde als multivalent beschrieben. Er kann durch den Gebrauch unterschiedlicher Kombinationen von individuellen Zinkfingern spezifisch an voneinander abweichende regulatorische DNA Sequenzen im Promoterbereich des c-Myc Gens aus Huhn, Maus und Mensch binden (Filippova *et al.*, 1996).

Die Promotoren des AdML (Adenovirus Major Late) und des Cyclin D1 Gens weisen Sequenzen an den Startstellen auf die spezifisch von Miz1 gebunden werden, was zur transkriptionellen Aktivierung dieser Gene führt. Die Mutation dieser Sequenz oder die Deletion der Zinkfinger inhibiert die Aktivierung des AdML Promoters durch Miz1. Weitere durch Miz1 aktivierte Gene sind p15^{Ink4b} (Staller *et al.*, 2001), p21^{Cip1} (Herold *et al.*, 2002; Seoane *et al.*, 2002) und Mad 4 (Kime und Wright, 2002). Diese Gene spielen in tumorsuppressorischen Signalwegen und zellulären Differenzierungsprozessen eine wichtige Rolle. Für die Aktivierung des p21^{Cip1} und des AdML Promoters ist die Bindung von Miz1 an die DNA erforderlich wie eine Zinkfingerdeletionsmutante von Miz1 darlegt, die keine Transaktivierungsaktivität

mehr aufweist (Peukert *et al.*, 1997; S. Herold, persönliche Mitteilung). Die Transaktivierung des p15^{Ink4b} Promoters dagegen bleibt von der Deletion der Zinkfinger unbeeinflusst (Seoane *et al.*, 2001). Im Vergleich dazu führt die Deletion der POZ-Domäne von Miz1 zu einem Verlust der Transaktivierung aller oben angegebenen Promotoren. Jedoch reicht die POZ-Domäne alleine nicht aus, um diese Promotoren zu aktivieren.

Miz1 ist in zahlreiche biologische Prozesse involviert und wird über verschiedene Mechanismen aktiviert. Ein Aktivierungsmechanismus ergibt sich aus der Assoziation der zytoplasmatisch lokalisierten Miz1 Proteine an Mikrotubuli (Peukert *et al.* 1997, Ziegelbauer *et al.* 2001). Durch die Veränderung der Mikrotubuli Architektur, die durch Zugabe synthetischer Substanzen wie T113242 und Colchicin ausgelöst werden kann, wird die Interaktion zwischen den Mikrotubuli und Miz1 gelöst. Freies Miz1 wird daraufhin in den Nukleus transloziert, wo es verschiedene Zielgenpromotoren aktivieren kann. Ein auf diese Weise aktiviertes Gen ist das LDLR Gen (Low density lipoprotein receptor). LDLR ist ein wichtiger Regulator des Cholesterol Metabolismus, der Cholesterol vom Blut in die Leberzellen transportiert. Die Miz1 abhängige Aktivierung des LDLR erfolgt unabhängig von dem Transkriptionsfaktor SREBP (Sterol Response Element Binding Protein), der nach Höhe des Cholesterolspiegeln ebenfalls die Expression von LDLR aktivieren kann. Ein weiteres, durch freies nukleäres Miz1 induziertes Gen stellt das α 2-Integrin dar. α 2-Integrin ist ein Kollagen Rezeptor, der die Migration und Proliferation von Zellen reguliert (Ziegelbauer *et al.* 2001 und 2004).

Ebenfalls aktiviert Miz1 den Promotor des Nramp1 Gens (Natural resistance-associated murine Protein1). Nramp1 kodiert für einen bivalenten Kationentransporter, der in Lysosomen und Endosomen von Makrophagen vorkommt. Nramp moduliert dort den zytoplasmatischen Eisenspiegel und inhibiert die DNA-Synthese. Die Expression von Nramp1 wird durch c-Myc gehemmt. C-Myc scheint in der Lage zu sein, die Konzentration des Eisens in der Zelle durch bestimmte Mechanismen wahrzunehmen. Miz1 antagonisiert die c-Myc abhängige Repression von Nramp1, vermutlich durch einen TGF- β vermittelten Signalweg (Bowen *et al.*, 2002).

Die durch Myc, in Miz1 abhängiger Weise reprimierten Gene, sind oft durch Miz1 transaktivierte Gene. Vergleichende Genprofilanalysen (Micro-Array Analysen) von

p53 heterozygoten embryonalen Mausfibroblasten, die entweder Myc Wildtyp oder eine nicht mehr an Miz1 bindende Punktmutante von Myc (MycV394D) expremierten, identifizierten zahlreiche Gene, die sich durch Myc Wildtyp jedoch nicht mehr durch die Punktmutante von Myc reprimieren ließen (Vincent Beuger, unveröffentlichte Daten). Diese Myc/Miz1 ko-regulierten Gene konnten entsprechend ihrer Funktion gruppiert werden. Die Tatsache, daß Miz1 diese unterschiedlichen Gengruppen aktiviert verdeutlicht die Regulation verschiedener zellulärer Prozesse durch Miz1.

Regulation des Zellzyklus:

- p21^{Cip1} (Herold *et al.*, 2002) und p57^{Kip2} (Dauphinot *et al.*, 2001): Inhibitoren der Zyklin-abhängigen Kinase
- C/EBP α (Lie *et al.*, 1994): Regulator der Körpergewichts-Homöostase (Miller *et al.*, 1996); Inhibitor der Zyklin abhängigen Kinasen CDK2 und 4, Wang *et al.*, 2001)
- Zac1: Zielgen und potentieller Ko-Aktivator von p53 (Huang *et al.*, 2001)
- GKLf: Zielgen von p53, Modulator der p53 abhängigen Aktivierung des p21Cip1 Promoters (Zhang *et al.*, 2000)
- Gas2: Wachstumsarrest-Gen, Regulator der p53 abbauenden Protease Calpain (Benetti *et al.*, 2001)

Zelladhäsion:

- Thrombomodulin: endotheliales Oberflächenglycoprotein, komplexiert mit Thrombin (Ishii und Majerus, 1985)
- Laminin: extrazelluläres Matrixprotein, präsent in allen Basalmembranen, (Ehrig *et al.*, 1990)
- Keratin: Komponente der intermediären Filamente in Epithelzellen (Parry D.A., 2005)

embryonale Entwicklung/ Homeo-Box Transkriptionsfaktoren:

- Hox D13
- Hox D11
- Fos

1.3. Die Myc-Miz1 Interaktion in ihrer biologischen Relevanz

1.3.1 Interferenz mit der TGF- β Signaltransduktionskaskade

TGF- β (transforming growth factor beta) ist ein multifunktionales Peptid, das unter anderem die Proliferation und die Differenzierung von Zellen kontrolliert (Dickinson *et al.*, 1990). In Epithelzellen bewirkt dieses antimitogene Zytokin einen Wachstumsarrest in der G1-Phase des Zellzyklus durch transkriptionelle Induktion von p15^{Ink4b}, um ein zu starkes Zellwachstum in normalen Geweben zu unterbinden. In bestimmten Zelllinien reguliert TGF- β auch die Expression von p21^{Cip1} (Datto *et al.*, 1995, Li *et al.*, 1995). Beides sind Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen. p15^{Ink4b} hemmt beispielsweise die Kinasen Cdk4 und Cdk6 und verhindert so die Phosphorylierung und Inaktivierung von pRB. Dadurch wird die Progression durch die G1-Phase des Zellzyklus gestoppt (Ewen *et al.*, 1993; Ewen *et al.*, 1995). Neben der Induktion von Genen, wird die Expression anderer Gene wie die von c-Myc (Coffey *et al.*, 1988) und Cdc25A (Iavarone und Massague, 1997) dagegen gehemmt. Der c-MYC Promoter enthält eine spezifische TGF- β Bindestelle über die TGF- β die Promoteraktivität hemmt (Chen *et al.*, 2001). E2F4 koaktiviert mit p300 über dieses Element den MYC-Promoter und TGF- β unterbindet diese Kooperativität.

Die TGF- β abhängige Genregulation erfolgt über verschiedene Schritte. Zum einen bindet TGF- β an den aus zwei transmembranen Serin/Threonin Kinasen bestehenden Rezeptor. Dieser wird dadurch aktiviert und phosphoryliert die TGF- β abhängigen Effektoren SMAD2 und SMAD3 an ihren C-terminalen Enden (Derynck *et al.*, 1998; Massague und Chen, 2000). Diese formieren sich zu einem Komplex mit SMAD4 und translozieren in den Nukleus. Im Nukleus reguliert dieser SMAD-Komplex die Transkription durch seine Fähigkeit mit weiteren Transkriptionsfaktoren zu interagieren (Derynck *et al.*, 1998; Massague und Wotton, 2000). Sp1 spielt dabei ebenfalls eine entscheidende Rolle, indem es an den Komplex aus SMAD2, SMAD3 und SMAD4 bindet. Als Teil eines Komplexes mit den SMAD Proteinen 3 und 4 kann Miz1 an das Initiatorelement in der Kernpromotorregion des p15^{Ink4b} Gens binden und dessen Transkription aktivieren. Die Infektion von Zellen mit Miz1 exprimierenden Retroviren führt in der Abwesenheit von TGF- β Signalen zu einer Induktion von p15^{Ink4b}, was zu einem pRB- abhängigen Wachstumsarrest führt (Staller *et al.*, 2001). Das Protein p300 dient bei der p15^{Ink4b} Aktivierung als Koaktivator von Miz1. Myc dagegen hemmt die Miz1-abhängige Transaktivierung

von p15^{Ink4b} indem es mit p300 um die Bindung an Miz1 konkurriert. Die Bindung des Myc/Max/Miz1 Komplex am Initiatorelement des p15^{Ink4b} Promoters führt zu dessen Repression. Die Erhöhung des TGF- β Spiegels in der Zelle hebt die Repression auf, weil TGF- β zu einer Reduktion der Myc Expression führt. Folglich kann Miz1 den Promoter nun synergistisch mit dem SMAD Komplex transaktivieren. TGF- β stimuliert dabei die Bindung von Miz1 an SMAD 3 (Seoane *et al.*, 2001).

Myc kann nicht nur die Transkription über die Bindung an Miz1 reprimieren, sondern es wurde beobachtet, daß Myc auch mit den SMAD Proteinen direkt interagiert. C-Myc interagiert mit den aktivierten Proteinen SMAD 2 und 3 und fördert die Ausbildung eines transkriptionell inaktiven SMAD/SP1/Myc Komplex. Myc konkurriert nicht mit Sp1 um die Bindung an SMAD 2 und 3, sondern formiert einen größeren inaktiven und vermutlich stabileren Komplex.

Der Sensibilitätsverlust der Zelle gegenüber den antiproliferativen Signalen von TGF- β wird als wichtiger Schritt in der Tumorentstehung angesehen (Hanahan und Weinberg, 2000). Mutationen und Fehlregulationen der Komponenten des TGF- β regulierten, wachstumshemmenden Signalweges führen dazu, daß die Zellen nicht mehr auf die TGF- β Signale reagieren. Die Inaktivierung der Gene für p15^{Ink4b}, SMAD 2 und 4, sowie des TGF- β Rezeptors ermöglichen es der Zelle, sich der TGF- β Kontrolle zu entziehen und fördern die maligne Transformation von Zellen (Barret *et al.*, 1996; Riggins *et al.*, 1997; Massague *et al.*, 2000).

In weiteren Publikationen wurde beschrieben, daß c-Myc die TGF- β -abhängige Expression von p15^{Ink4b} in Lungeneithelzellen (Warner *et al.*, 1999) und die p21^{Cip1} Expression in HaCaT Zellen (Claaßen und Hann, 2000) inhibieren kann. So kann es durch Amplifikation des c-MYC Gens in einigen humanen Tumoren zu einer Resistenz der Zellen gegenüber TGF- β kommen. Beispielsweise werden kultivierte Eithelzellen durch ektopische Expression von c-Myc, die normalerweise einen TGF- β -abhängigen Wachstumsarrest zeigen, resistent gegenüber den antiproliferativen Effekten von TGF- β (Alexandrow *et al.*, 1995, Warner *et al.*, 1999).

1.3.2 Interferenz mit der Wnt Signaltransduktionskaskade

Die Wnt Signaltransduktionskaskade spielt eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung. Sie reguliert unter anderem die Anzahl der Stammzellen

in Epithelien der Haut und des Darms, die ständig erneuert werden (Korinek *et al.*, 1998). Eine durch Mutationen bedingte Fehlregulation des Wnt Signalweges in diesen Geweben ist oft mit einer malignen Transformation der Zellen verbunden. Das Darmepithelium stellt eines der am Besten verstandenen Beispiele für die eng verbundene Rolle des Wnt Signalweges in dem zellulären Prozeß der homöostatischen Selbsterneuerung und maligner Zelltransformation dar.

Wnt ist ein Glykoprotein das an den Zelloberflächen-Rezeptor Frizzled bindet, der daraufhin das zytoplasmatische Protein Dishevelled aktiviert. Dishevelled inhibiert einen Komplex aus den Proteinen GSK-3, Axin und APC, die den Faktor β -Catenin destabilisieren. Als transkriptioneller Koaktivator bindet β -Catenin an den Transkriptionsfaktor TCF-4 der zur Familie der Tcf/LEF Proteine gehört. Die so aktivierte Wnt Signalkaskade (s.Abb. 2) führt zur transkriptionellen Aktivierung zahlreicher Zielgene wie zum Beispiel Cyclin D1 (Tetsu und McCormick, 1999), c-Jun (Mann *et al.*, 1999) und c-Myc (He *et al.*, 1998). Der Promoter des c-Myc Gens besitzt mehrere Tcf-4 Bindestellen, an die der Komplex aus Tcf-4 und β -Catenin zur Aktivierung bindet. Während der Differenzierungsprozesse der epithelialen Kolonzellen nimmt die Konzentration von β -Catenin ab, was die Abnahme der TCF-Aktivität zur Folge hat. Auf diesem Weg wird die Expression von c-Myc herunterreguliert und Miz1 aus dem repressorischen Einfluß von c-Myc gelöst. Dieses führt zu einer verstärkten Expression von p21^{Cip1} (van de Wetering *et al.*, 2002). In proliferierenden epithelialen Kolonzellen bindet der Myc/Max/Miz1 Komplex an den Kernbereich des p21^{Cip1} Promoters. In differenzierenden epithelialen Kolonzellen hingegen nimmt die Menge an gebundenem Myc erheblich ab. Die Menge an Miz1 bleibt jedoch unverändert. Die Expression einer dominant-negativen Variante des Tcf-4 Proteins führt in kultivierten Kolonkarzinom Zellen zu einem Zellzyklusarrest und zur Differenzierung. Dieser Phänotyp wird durch die transkriptionelle Aktivierung von p21^{Cip1} hervorgerufen. Die Expression von c-Myc nimmt dabei gleichzeitig ab.

Durch ektopische Expression von c-Myc wird die Transaktivierung von p21^{Cip1} inhibiert und folglich eine Induktion des Zellzyklusarrestes und der Differenzierung unterbunden. Daraus läßt sich ableiten, daß die Reduktion von c-Myc ein wesentlicher Schritt in der Wnt Signalkaskade darstellt. Für die Regulation der Proliferation und der Differenzierung durch Tcf-4 und Myc ist p21^{Cip1} essentiell und allein ausreichend (van de Wetering *et al.*, 2002).

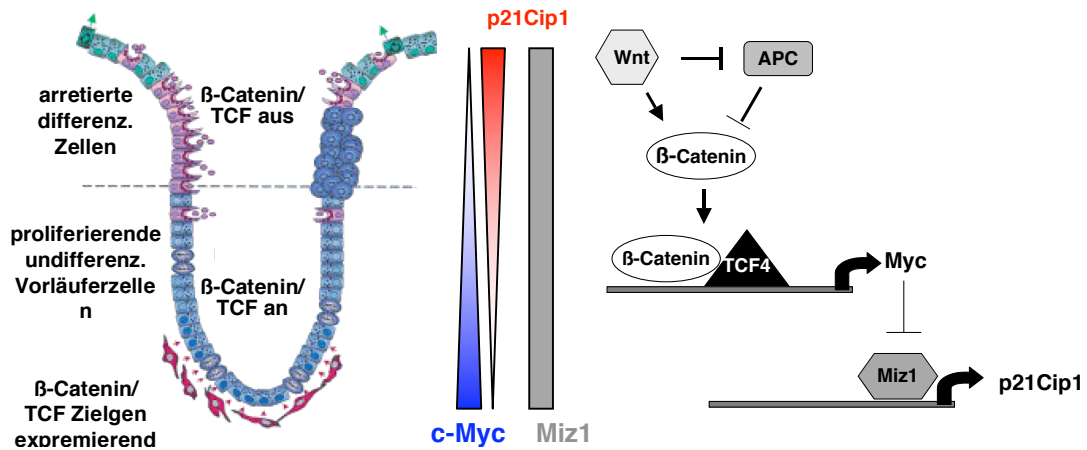


Abbildung 2: Wnt regulierte zelluläre Differenzierung von epithelialen Kolonzellen

Schematische Darstellung einer Darmkrypte und der Wnt-Signaltransduktionskaskade. Im unteren Drittel der Krypte akkumulieren proliferierende undifferenzierte Vorläuferzellen nukleäres β -Catenin und exprimieren als Folge β -Catenin/TCF abhängige Zielgene. Dabei hält die induzierte Expression von Myc die Proliferation aufrecht und der Myc-Miz1 Komplex unterdrückt die Expression von $p21^{Cip1}$. In der mittleren Region nimmt die Aktivität des β -Catenin/TCF Komplexes ab, die Zellproliferation nimmt ab und die Zellen differenzieren zu funktionellen Darmzellen. Es kommt zur Abnahme der Myc Expression und Induktion der Miz-1 abhängigen $p21^{Cip1}$ Expression (nach Wetering *et al.*, 2002).

1.3.3 Interferenz mit zellulärer Differenzierung im hämatopoetischen System

Zu dem Zeitpunkt der terminalen Differenzierung, wenn die Zellen der humanen Monoblasten Zelllinie U-937 die morphologische Gestalt von Monozyten und Makrophagen annehmen, exprimieren sie mit der Differenzierung verbundene Antigene und arretieren in der G0/G1 Phase des Zellzyklus. Dieser Prozeß ist assoziiert mit der Herunterregulation der c-Myc Expression (Oberge *et al.*, 1991). Signale, die die zelluläre Differenzierung stimulieren, führen in vielen Zellsystemen zur Induktion der $p21^{Cip1}$ Expression (Liu *et al.*, 1996). Die Induktion von $p21^{Cip1}$ kann in hämatopoetischen Zellen Miz1 abhängig durch Myc inhibiert werden. Myc bildet mit Miz1 einen repressiven Komplex auf dem proximalen $p21^{Cip1}$ Promoter (Wu *et al.*, 2003). Während der Differenzierungsphase nimmt einerseits die Expression von c-Myc ab und auf der anderen Seite die Expression von Miz1 zu. Die Frage, ob $p21^{Cip1}$ das einzige während der zellulären Differenzierung durch den Miz1/Myc Komplex regulierte Gen ist oder ob der Komplex noch weitere Gene im Differenzierungsprogramm reguliert, ist derzeit noch ungeklärt.

In proliferierenden Zellen bindet der Myc/Miz1 Komplex an den proximalen Promoter des Mad4 Gens, wodurch dessen Transkription gehemmt wird. Erst mit dem

Verlust von Myc aus diesem Komplex kommt es zu einer Induktion von Mad4 (Kime und Wright, 2003).

Die Schwankungen in der Expression der Gene der c-Myc und Mad Familie (Mad1, Mxi1, Mad3 und Mad4) spielen eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der zellulären Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen oder Epidermiszellen (Eisenman, 2001). Die Differenzierung geht mit einer Reduktion der c-Myc Expression und einem begleitendem Anstieg in der Mad Proteinmenge einher. Die Differenzierung kultivierter muriner Erythroleukose Tumorzellen, die Proerythroblasten gleichen, kann durch ektopische c-Myc Expression verhindert werden (Coppola und Cole, 1986) und wird anders herum durch die ektopische Expression von Mad beschleunigt (Cultraro *et al.*, 1997). Die zielgerichtete Zerstörung der Mad Gene resultiert in einem Defekt des Zellzyklusarrestes während der späten Phase der Granulozyten Differenzierung (Foley *et al.*, 1998). Vorhergehende Studien haben gezeigt, daß die verschiedenen Mad Gene während spezifischen Phasen des Zellzyklus und der Differenzierung expremiert werden. So sind zum Beispiel die Expression von Mad1 und Mad4 begrenzt auf die späten Stadien der Differenzierung von adulten Mäusen und sich entwickelnden Embryonen (Queva *et al.*, 1998; Hurlin *et al.*, 1995). Mad Proteine sind ebenfalls während der späteren Differenzierungsphasen von kultivierten 3T3-L1 Adipoblasten (Pulverer *et al.*, 2000) und P19 Pheochromocytoma Zellen (Queva *et al.*, 1998) induziert. Die Beobachtung, daß die Induktion von Mad4 assoziiert ist mit der Differenzierung vieler Zelllinien, reflektiert eine integrale Eigenschaft der verschiedenen Differenzierungsprogramme und demonstriert eine wichtige Rolle von Myc und Miz1 in der Regulation dieser zellulären Differenzierungsprozesse. Des weiteren erklärt die Miz1 abhängige Inhibition von Mad durch Myc den Umbau von Myc/Max zu Mad/Max Komplexen in der Differenzierung von Monozyten.

1.3.4 Miz1 in der Regulation der zellulären Homöostase

In neueren Studien wurde eine Verbindung zwischen c-Myc und der zellulären Eisenregulation gefunden. Eisen ist essentiell für das Zellwachstum und eine beeinträchtigte Eisenhomöostase, wie sie durch Mutationen im Nramp1 (Natural Resistance-associated Protein1 Promoter) Gen entstehen kann, führt zu einem erhöhten Infektionsrisiko. Nramp1 verringert den Eisengehalt im Zytosol von

Makrophagen, was die Eisen-abhängige Expression von Genen und andere Eisen-abhängige Prozesse beeinflusst. Darüber wird die Zellproliferation verlangsamt und die DNA Synthese verringert. c-Myc zeigt im Vergleich zu Nramp1 eine antagonistische Regulation der Gene IRP2 (iron regulatory protein 2) und H-Ferritin, was vermuten läßt, daß c-Myc den zytosolischen Eisenspiegel für Wachstumsprozesse erhöht (Wu *et al.*, 1999). Das *NRAMP1*-Gen, das für einen bivalenten Kationen-Antiporter kodiert, wird selbst durch Myc negativ reguliert. Diese Myc vermittelte Repression wird durch die Koexpression von Miz1 gehemmt. Miz1 transaktiviert den Nramp1 Promoter schon in niedrigen Konzentrationen (Bowen *et al.*, 2002). Der Nramp1 Promoter enthält zwei Initiator Elemente, welche die Miz1 abhängige Repression durch Myc vermitteln.

1.4 Biologische Relevanz der Genaktivierung durch Miz1

1.4.1 Miz1 in der Embryogenese und Differenzierung

Miz1 ist während der Maus Embryogenese ubiquitär expremiert und für eine korrekte Gastrulation und embryonale Entwicklung notwendig (Adhikari *et al.*, 2003). Eine Deletion des Miz1 Genlokus in der Maus durch homologe Rekombination führt zu einer frühen Letalität der Embryonen um den Tag 7.5. Sie zeigen eine stark retardierte embryonale Entwicklung und eine fehlerhafte Gastrulation. Die Zellen des Ektoderms unterliegen massiver Apoptose. Die für Miz1 heterozygoten Mausembryonen dagegen unterscheiden sich nicht vom Wildtyp.

Da Miz1 die Zellproliferation von Fibroblasten Zellen hemmt, könnte man vermuten, daß die Miz1^{-/-} Zellen aufgrund von fehlregulierter Proliferation sterben. Dieses konnte in den knockout Embryonen jedoch nicht beobachtet werden. Die prozentuale Zahl der proliferierenden Zellen ist in den Wildtyp Embryonen höher im Vergleich zu den Miz1^{-/-} Embryonen, was das schnelle Wachstum der normalen Embryonen in dieser Wachstumsphase reflektiert. Es gibt keine Hinweise, daß Miz1 die Zellproliferation während der Gastrulation negativ reguliert.

Miz1 ist beteiligt an der Regulation der Zellzyklusinhibitoren p15^{Ink4b}, p21^{Cip1} und p57^{Kip2}. Während der frühen embryonalen Entwicklung ist der Inhibitor p15^{Ink4b} nicht expremiert und für die Expression von p21^{Cip1} während der Embryonalentwicklung

der Maus wird Miz1 nicht benötigt. Jedoch hängt die Expression von p57^{Kip2} im ausgebildeten Konus des Plazentatrophoblasten, einer Ausstülpung des Trophoderms, die den Kontakt zur Uteruswand herstellt, von Miz1 ab. Miz1 deletierte Embryonen zeigen im Vergleich zu Wildtyp Embryonen eine reduzierte Expression von p57^{Kip2}.

Die Beobachtung, daß Miz1^{-/-} Embryonen nach mehrfachen Zellteilungen sterben läßt vermuten, daß der Transkriptionsfaktor Miz1 nicht generell für die Initiator-Element abhängige Transkription benötigt wird, aber spezifische Signale an die Promotoren vermittelt, die er bindet. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß Miz1 Signale vermittelt, die die Adhäsion von Ektodermzellen beeinflussen und somit deren Überleben. Würde diese Vermutung stimmen, könnte es die stark reduzierte Adhäsion von Fibroblasten und Stammzellen erklären, die eine fehlregulierte Expression von Myc aufweisen (James *et al.*, 2002). Die genauen Mechanismen müssen durch weitere Knockout-Modelle geklärt werden.

Der Einfluß von Myc und Miz1 auf die Zelladhäsion wurde in der Studie von Gebhardt *et al.* (2006) genauer analysiert. Es konnte gezeigt werden, daß Miz1 für die Myc-abhängige Regulation der Adhäsion und Differenzierung von Keratinozyten eine wichtige Rolle spielt. Endogenes Miz1 ist in der Basalschicht der Mausepidermis stark expremiert und viele Gene, die an der Zell-Zelladhäsion oder Zell-Matrix Adhäsion von Keratinozyten beteiligt sind, werden von Myc durch Bindung an Miz1 reguliert.

Myc und Miz1 stehen mit der Expression der Zellzyklusinhibitoren p15^{Ink4b} und p21^{Cip1} in Zusammenhang und beide Zellzyklusinhibitoren können durch den Wachstumsfaktor TGF-β in verschiedenen Zelltypen induziert werden (Hannon und Beach, 1994; Florenes *et al.*, 1996). TGF-β hat in primären Mauskeratinozyten keinen Einfluß auf die Expression von p21^{Cip1}, aber auf die Expression von p15^{Ink4b}. In Expressionsstudien mit einer Myc-Mutante (MycV394D), die nicht mehr an Miz1 binden kann (Herold *et al.*, 2002), konnte TGF-β die Expression von p15^{Ink4b} in Kontroll- und in MycV394D expremierenden Keratinozyten erhöhen, aber nicht in Keratinozyten, die Wildtyp Myc expremieren. Die Bindung von Myc an Miz scheint somit entscheidend zu sein für die Inhibition der Expression von p15^{Ink4b} und das Fortanschreiten des Zellzyklus in den Keratinozyten in Anwesenheit von TGF-β. Microarray Analysen identifizierten eine Gruppe von Gene, die für extrazelluläre

Matrixproteine, Zelloberflächenrezeptoren für extrazelluläre Matrixproteine, Zell-Zell- oder Zell-Matrix Adhäsionsproteine kodieren und die durch Myc Wildtyp aber nicht MycV394D reprimiert werden. Diese Daten zeigen, daß die Bindung von Myc an Miz1 eine Reihe von Genen reguliert, die die Adhäsionseigenschaften von Keratinozyten bestimmen. Durch Chromatinimmunpräzipitations-Experimente (ChIP) wurde nachgewiesen, daß der Myc-Miz1 Komplex *in vivo* an die Transkriptionsstartpunkte einiger dieser Adhäsionsproteine (Integrin $\alpha 6$, Integrin $\beta 1$, Integrin $\beta 4$ und Procollagen I $\alpha 2$) bindet. Die Ausbreitung von Keratinozyten *in vitro* in einer Kollagenmatrix sowie die Motilität von Keratinozyten wird durch Wildtyp Myc aber nicht MycV394D inhibiert.

Die Expression des Integrin $\beta 1$ wurde in Verbindung gebracht mit dem Austritt der Stammzellen aus ihrem Stammzellkompartiment (Gandarillas *et al.*, 2000; Waikel *et al.*, 2001). Studien an individuellen Keratinozytenzellklonen zeigten, daß die Expression von Wildtyp Myc im Vergleich zu Kontroll-oder MycV394D exprimierenden Keratinozyten zu einer geringeren und unvollkommeneren Koloniebildung führt. Dieses läßt vermuten, daß Myc den Austritt von Stammzellen aus ihrem Stammzellkompartiment fördert.

Insgesamt betrachtet zeigen die Daten, daß die Regulation der Zelladhäsion eine Hauptfunktion des Myc-Miz1 Komplexes ist und vermutlich zum Myc-induzierten Austritt der epidermalen Stammzellen aus ihrem Stammzellkompartiment beiträgt.

1.4.2 Miz1 in der DNA Schadensantwort

Neben dem Tumorsuppressorprotein p53 spielt auch Miz1 bei der Reaktion der Zelle auf DNA-Schädigungen eine bedeutende Rolle. Als ein Effektorgen von p53 besitzt der p21^{Cip1}-Promotor zwei p53-bindende Elemente (El-Deiry *et al.*, 1995). Nach UV-Bestrahlung ist p53 notwendig für die Expression des Zyklus abhängigen Kinase Inhibitors p21^{Cip1} und führt zum Anhalten des Zellzyklus in der G1-Phase (Deng *et al.*, 1995). Dieser Effekt der Schadensantwort kann durch Myc inhibiert werden, da auch Miz1 an der Erhöhung der p21^{Cip1}-Expression nach DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung beteiligt ist. Bei der Bindung von Myc an Miz1 wird die Transaktivierungsaktivität von Miz1 gehemmt und die Induktion der p21^{Cip1}-Expression unterbunden (Abb 3a). Die Myc-vermittelte Repression des p21^{Cip1}-

Promotors involviert möglicherweise die Rekrutierung der Methyltransferase Dnmt3a als Korepressor (Brenner *et al.*, 2004). Dnmt3 methyliert DNA an CpG-Dinukleotiden und führt zur transkriptionellen Repression von Genen. Die Repression erfolgt mechanistisch vermutlich durch die Ausbildung eines ternären Komplexes aus Miz1, Myc und Dnmt3a am p21^{Cip1}-Promotor. Die Korepressor-Aktivität von Dnmt3a und Myc ist dabei von der Interaktion zwischen Miz1 und Myc abhängig.

Die Funktion von Miz1 wird noch durch einen weiteren Faktor reguliert: das Protein TopBP1 (Topoisomerase II binding protein 1). TopBP1 wurde im Rahmen eines Hefe Zweihybrid-Screens als Interaktionspartner von Miz1 identifiziert (Herold *et al.*, 2002). Das humane TopBP1-Protein zeichnet sich durch den Besitz von acht BRCT Domänen (BRCA1 Carboxy-Terminus) aus. BRCT-Motive wurden ursprünglich für das Bra1 Protein (Breast cancer susceptibility protein 1) beschrieben (Koonin *et al.*, 1996). Die Assoziation mit Miz1 wird über die 7. und 8. BRCT Domäne des TopBP Proteins vermittelt, wodurch die Transaktivierungsaktivität von Miz1 negativ reguliert wird.

Nach Behandlung mit Ionisierungsstrahlung oder nach Replikationsstress wird TopBP1 durch ATM (ataxia-telangiectasia mutated kinase) phosphoryliert (Yamane *et al.*, 2002). Außerdem kolokalisiert TopBP1 nach DNA-Schädigung mit Foci, die blockierte Replikationsgabeln repräsentieren und mit Proteinen, die für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen wichtig sind wie zum Beispiel PCNA, PML, hRad9 ATM, ATR BRCA1, 53BP1 und γ -H2AX (Mäkineniemi *et al.*, 2001, Yamane *et al.*, 2002, Honda *et al.*, 2002, Jurvansuu *et al.*, 2005, Xu *et al.*, 2003, Greer *et al.*, 2003, Perera *et al.*, 2004). Während der Mitose ist TopBP1 zusammen mit BRCA1 in den Zentrosomen nachweisbar. In der meiotischen Prophase assoziiert es mit dem Axialkern und dem XY-Chromosomenpaar (Reini *et al.*, 2004). Aufgrund dieser verschiedenen Interaktionen wird TopBP1 mit der DNA-Replikation, den Zellzyklus-Kontrollpunkten am G1/S- und am G2/M-Übergang, sowie mit dem Kontrollpunkt der meiotischen Rekombination in Verbindung gebracht.

In ungestreßten Zellen bildet eine Teilfraktion von Miz1 einen inaktiven Komplex mit TopBP1. Dadurch ist die Transaktivierungsaktivität von Miz1 inhibiert. Nach UVB-Behandlung wird Miz1 aus diesem Inhibitions-Komplex entlassen und kann zur transkriptionellen Aktivierung an die Initiatorelemente der Zielgene p15^{Ink4b} und

p21^{Cip1} binden und die Expression dieser Gene zusammen mit aktivierten p53 Proteinen erhöhen (Abb.3b). Die in der Zelle vorhandenen freien TopBP1 Moleküle werden im Zellkern in diskrete nukleoläre Kompartimente verteilt (Herold *et al.*, 2002). Die bisherigen Ergebnisse weisen auf eine Funktion von Miz1 und TopBP1 in einem DNA-Schadenskontrollpunkt hin. Diese Kontrollpunkte regulieren das Anhalten des Zellzyklus nach erfolgter DNA-Schädigung, um der Zelle Zeit für ihre Reparaturmechanismen zu schaffen. TopBP1 könnte in diesem Fall das Sensorprotein sein, das über einen UV-empfindlichen Promoter reguliert wird, und Miz1 würde den Effektor dieser Signalkette darstellen.

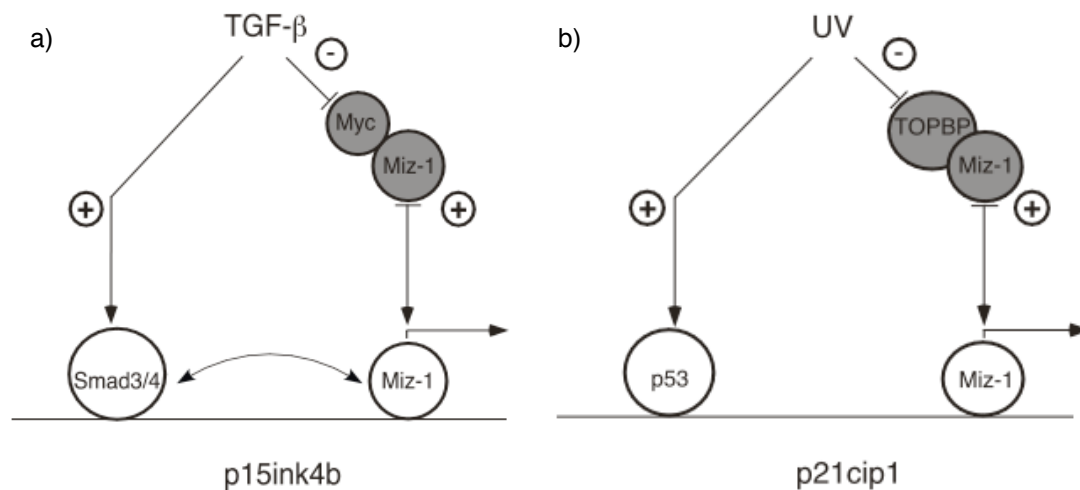


Abbildung 3.: „Two-Input“ Model.

Schematische Darstellung der Miz1-abhängigen transkriptionellen Regulation von p15^{Ink4b} im TGF-β Signalweg (a; Seoane *et al.*, 2001) und p21^{Cip1} nach UV-Schädigung (b; Herold *et al.*, 2002).

Nach UVB-Behandlung wird in HaCat Zellen die Expression von TopBP1 gehemmt und es kommt zu einer Miz1 abhängigen transkriptionellen Aktivierung der Expression des Zyklin abhängigen Kinase Inhibitors p15^{Ink4b}. Beide Effekte reagieren sensitiv auf die Zugabe von Koffein, was auf einen ATM/ATR abhängigen Signalweg bei der transkriptionellen Regulation beider Gene hinweist (Herold *et al.*, 2002). Dieses stimmt überein mit der Beobachtung, daß TopBP1 durch Phosphorylierung durch die ATM/ATR Kinasen reguliert wird (Yamane *et al.*, 2002). Die Bestrahlung mit UVB-Licht von HaCat Zellen führt zu einem vorübergehenden Stop des Zellzyklus und zu einem verzögerten Eintritt in die S-Phase (Magal *et al.*, 1998, Potter *et al.*, 2000). Die nach DNA-Schaden induzierte p15^{Ink4b} Induktion in HaCat-

Zellen stellt anscheinend einen p53 unabhängigen Schutzmechanismus der Keratinozytenzellen dar, weil diese kein funktionelles p53 exprimieren. Das p53 *bona fide* Zielgen p21^{Cip1}, welches den Wachstumsarrest nach DNA-Schädigung induziert, wird in HaCat Zellen nach UV-Bestrahlung p53 unabhängig reguliert (Herold *et al.*, 2002). Nach Gammabestrahlung sind weder p53 noch p21^{Cip1} für die Inhibition der CyclinE/Cdk2 Kinaseaktivität und der DNA-Synthese notwendig. Jedoch sind für beide Effekte die ATM/ATR Kinaseaktivitäten essentiell (Xie *et al.*, 1998).

TopBP1 reguliert auch die E2F1 vermittelte Apoptose. Es interagiert mit E2F1, aber nicht mit den anderen E2F Familienmitgliedern, und reprimiert dessen proapoptostische Aktivität. Dieser Regulationsmechanismus benötigt den PI3-Kinase/Akt Signalweg. Akt phosphoryliert TopBP1 und induziert darüber eine Oligomerisierung dieses Proteins, die notwendig ist für die darauffolgende Interaktion mit E2F1 und Repression von E2F1. Die Phosphorylierung durch Akt ist ebenfalls notwendig für die Interaktion von TopBP1 mit Miz1 und der Inhibierung der Miz1-abhängigen Transkriptionsaktivierung (Liu *et al.*, 2006).

1.5 Interaktionspartner von Miz1

1.5.1 Interaktion von Miz1 mit anderen Tumorsuppressoren

In humanen Speiseröhren-Krebszellen wurde ECRG1 (Esophageal Cancer Related Gene 1) als ein neues Tumorsuppressorgen identifiziert. Einige der bekannten Tumorsuppressor und Onkogene sind an der Entstehung diese Krebses beteiligt (Montesano *et al.*, 1996). Studien zeigten, daß ECRG1 direkt mit Miz1 interagiert und im Zellkern kolokalisiert. Transfektionen von ECRG1 in eine aus Speiseröhren-Tumoren erhaltene Zelllinie (EC 9706) inhibierten die Zellproliferation und induzierten einen Wachstumsarrest in der G1-Phase des Zellzyklus. Kotransfektionen von ECRG1 und Miz1 führten jedoch zu wesentlich stärkeren Effekten auf die Hemmung der Zellproliferation und Induktion des Zellzyklusarrestes. Die Interaktion von ECRG1 und Miz1 ist in Ösophagus Krebszellen (EC 9706) in der Lage die p15^{Ink4b} Expression zu induzieren. Die ektopische Expression von ECRG1 oder Miz1 allein konnte die p15^{Ink4b} Expression jedoch nicht vollständig aktivieren (Zhao *et al.*, 2004). Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, daß ECRG1 in Speiseröhren-

Krebszellen das Tumorwachstum durch die Regulation des Zellzyklus hemmen kann und das die aus der Interaktion von ECRG1 und Miz1 resultierende Expression von p15^{Ink4b} die Blockierung des Zellzykluses in der G1-Phase verstärkt. Somit spielt die physiologische Interaktion von ECRG1 und Miz-1 in der Karzinogenese von Speiseröhren-Krebszellen vielleicht eine wichtige Rolle, indem sie ein Tumorzellwachstum verhindern könnten.

1.5.2 Miz1 und HCF-1

HCF-1 (Human Host Cell Factor 1) ist notwendig für das Voranschreiten des Zellzyklus. Es spielt auch eine Rolle bei der viralen DNA-Synthese in der frühen Phase des Replikationszyklus von Viren in Verbindung mit dem viralen Transaktivator VP16 des Herpes Simplex Virus.

Es wurde gezeigt, daß HCF-1 mit Miz1 direkt über zwei Bindestellen in der N-terminalen POZ-Domäne und der C-terminalen Region (637-803) interagiert, die auch die Interaktion zwischen Miz1 und p300 oder Miz1 und Myc vermittelt (Piluso *et al.*, 2002). Dieser C-terminale Bereich fungiert als Transaktivierungsdomäne, wenn sie an DNA bindet. Interaktionsstudien haben gezeigt, daß HCF-1 mit der Rekrutierung von p300 an das Miz1 Protein interferiert, so wie es für Myc beschrieben wurde. HCF1 reprimiert die Miz1 vermittelte Transaktivierung des p15^{Ink4b} Promoters. Miz1 beeinflusst diese Region. Durch diese Interaktion wird die Transaktivierungsaktivität von Miz1 gehemmt. HCF-1 interferiert mit der Rekrutierung von p300 an das Miz1 Protein. Somit funktioniert HCF-1 in einer analogen Weise wie c-Myc in der Modulation von Miz1. Die Interaktion zwischen Miz1 und HCF-1 verändert die Funktion von Miz1, was Konsequenzen für die Genregulation hat und einen entgegengesetzten Effekt auf den Zellzyklus bewirkt. Die biologische Relevanz dieser HCF-1/Miz1 Interaktion und ihre funktionale Wechselwirkung mit anderen Faktoren in der Zellzykluskontrolle und Genregulation ist derzeit noch nicht untersucht.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war mit Hilfe eines retroviralen „Screen-Verfahrens“ neue Inhibitoren der wachstumshemmenden Funktion des Myc interagierenden Zinkfingerproteins Miz1 zu isolieren und zu charakterisieren.

In Kolonie-Wachstumsexperimenten konnte beobachtet werden, daß die ektopische Expression von Miz1 zu einer Hemmung der Koloniebildung führte. Miz1 induziert in diesen Zellen einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus als auch Apoptose. Es ist bekannt das Myc durch direkte Interaktion mit Miz1 dessen repressorische Aktivität hemmen kann. Weiterhin wurden in diesem Zusammenhang die Tumorsuppressorproteine pRb und p53 als Effektoren identifiziert. Es wurde gezeigt, daß deren Funktion durch den Myc-Miz1 Komplex negativ reguliert wird. Kolonie-Wachstumsstudien an Rat1 Fibroblasten, in denen durch die Expression der viralen Proteine E1A und E7 direkt mit der Funktion von pRb und p53 interferiert wurde, zeigten keine Aufhebung der Miz1 induzierten Wachstumshemmung. Auch die ektopische Expression des ant-apoptotischen Faktors Bcl-2 konnte den Miz1 Effekt nicht antagonisieren. Diese Ergebnisse verdeutlichen das die biologische Funktion von Miz1 im Wesentlichen noch nicht aufgedeckt wurde.

Eine interessante Fragestellung die sich aus diesem Zusammenhang ergab und in dem Rahmen dieser Arbeit bearbeitet wurde, war die Identifizierung von neuen Inhibitoren der wachstumshemmenden Funktion von Miz1 in der Zelle. Da die Überexpression von Miz1 in Rat1 Fibroblasten einen genau definierten Phänotyp erzeugt, bot sich die Möglichkeit ein retrovirales „Screen“-Verfahren aufzubauen, um zelluläre Inhibitoren der Miz1 Funktion zunächst zu isolieren und im Folgenden zu charakterisieren. Dazu sollte zunächst ein primärer „Rescue-Screen“ unter der Verwendung einer retroviralen cDNA Expressionsbibliothek aufgebaut werden. Ziel des primären „Screens“ ist es Zellkolonien zu erzeugen, die durch den Zugewinn einer retroviralen cDNA den durch ektopische Miz1 Expression induzierten Wachstumsarrest zu überwinden. Diese Zellklone sollten in einem sekundären Rescue-Screen überprüft werden. Dabei sollten die retroviralen cDNA Insertionen der aus dem primären Screen erhaltenen Zellklone mittels Mouse Molony Viren mobilisiert und auf neue Zellen übertragen werden, um ihre Fähigkeit den Miz1 induzierten Wachstumsarrest zu überkommen zu bestätigen. In einem letzten Schritt sollten die retroviralen cDNA Sequenzen, die einen potentiellen Miz1 Inhibitor

kodieren, mittels PCR Technik isoliert, identifiziert und kloniert werden. Identifizierte Kandidaten sollten weiter charakterisiert werden auf ihre Fähigkeit die Miz1 abhängige Genexpression zu inhibieren und den genauen Mechanismus dieser Inhibition zu analysieren.

Eine zweite Fragestellung die in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden sollte war die Bestätigung und Charakterisierung des 14-3-3 eta Proteins als Inhibitor der wachstumshemmenden Funktion von Miz1. 14-3-3eta wurde in einem anderen retroviralen „Screen-Ansatz“ isoliert, wo es die wachstumshemmende Eigenschaft von Miz1 hemmte. Verschiedene biochemische und molekularbiologische Methoden sollten verwendet werden, um die inhibitorische Aktivität von 14-3-3 eta auf die Miz1 Funktion zu untersuchen. Es ging im wesentlichen um die Beantwortung der Fragen ob 14-3-3 eta die Miz1 abhängige Genexpression hemmt, ob die beiden Proteine direkt miteinander interagieren und welcher Mechanismus dieser Hemmung zu Grunde liegt. Interessant in diesem Zusammenhang war die Frage, ob die inhibitorische Funktion von 14-3-3 eta abhängig von Myc ist. Als Letztes sollte versucht werden die biologische Relevanz der 14-3-3 eta abhängigen Hemmung der Miz1 Funktion für die Zelle aufzuklären

2. Material

2.1 Stämme und Zelllinien

2.1.1 Bakterienstämme

XL1-Blue E.coli recA endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1lac
[F'proABlacI^qZΔM15Tn10 (tet^r)]

DH5α E.coli Fφ80dlacZΔM15Δ(lacZYAaegF)U169 deoR recA1
endA1 hsdR17 (r_Kⁱ,m_K⁺)phoAsupE44 λ-thi-1 gyr A96 relA1

2.1.2 Säugerzellen

HaCaT humane Keratinozyten-Zelllinie (freundlicherweise von N.E.
Fusenig, Heidelberg, zur Verfügung gestellt)

HeLa humane Zervix-Karzinom-Zelllinie (ATCC)

IMR 32 Humane Neuroblastomazelllinie, aus Zellen eines einjährigen
Kaukasiers gewonnen (ATCC; Tumulowicz *et al.* 1970)

Ls174T Humane Colon-Adenokarzinom-Zelllinie, epithelialer Ursprung

MoMuLV MoMuLV (Moloney murine leukemia virus) retrovirale
Verpackungs Zelllinie, aus Maus stammend;
(freundlicherweise von T. Möröy, Essen, zur Verfügung
gestellt)

NIH3T3 murine Fibroblastenzelllinie (ATCC)

Phoenix^{ECO} Humane *Packaging* Zelllinie für rekombinante, ecotrophe
Retroviren (Grignani et al., 1998)

Rat1 Rattenfibroblasten-Zelllinie (Topp, 1981)

2.2 Medien

2.2.1 Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium 10g Trypton
 5g Hefeextrakt
 5g Glucose
 ad 1000ml H₂O, pH 7,0

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

SOB-Medium 20g Trypton
 5g Hefeextrakt
 10mM NaCl
 2,5mM KCl
 10mM MgCl₂
 10mM MgSO₄

SOC-Medium SOB-Medium
 1% 2M Glucose

2.2.2 Medien für die Zellkultur

Medien für die Zellkultur wurden von der Firma BioWhittaker (Verviers, Belgien) geliefert. Fetales Kalbserum (FCS) sowie Kalbserum (CSB) wurde von der Firma Sigma und der Firma Invitrogen bezogen.

Vollmedium für Säugerzellen

DMEM 500ml DMEM (*Dulbeccos modified Eagles Medium*),
 mit Phenolrot
 50ml FCS wärmeinaktiviert (30min bei 56°C) oder
 50ml CSB (für NIH 3T3-Zellen)
 5ml Penicillin (10.000U/ml)/Streptomycin (10mg/ml)
 5ml L-Glutamin (200mM)

RPMI	500ml RPMI-1640 (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>) mit Phenolrot 50ml FCS wärmeinaktiviert (30min bei 56°C) oder 50ml CSB (für NIH 3T3-Zellen) 5ml Penicillin (10.000U/ml)/Streptomycin (10mg/ml) 5ml L-Glutamin (200mM)
Einfriermedium	DMEM- oder RPMI-Vollmedium s.o. 20% FCS 10% DMSO

2.3 Synthetische Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG, Ebersberg synthetisiert und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in H₂O aufgenommen und auf 100µM eingestellt.

2.3.1 Primer für die RT-PCR

Expressionsanalyse humaner Gene

<i>MIZ-1</i>	5'-primer: 5'-ACCAGGGCAAGGCAGGCATCAAG-3' 3'-primer: 5'-GCAGGCGGGGGACATTCAGGAG-3'
<i>MYC</i>	5'-primer: 5'-CTGCGACCCGGACGACGAGACC-3' 3'-primer: 5'-TGGGGCTGGTGCATTTTCGGTTGT-3'
<i>GAPDH</i>	5'-primer: 5'-GGGGTGAGGCCGGTGCTGAGTAT-3' 3'-primer: 5'-CATTGGGGGTAGGAACACGGAAGG-3'
<i>14-3-3eta</i>	5'-primer: 5'-CGGGATCCACCATGGGGGACCGGGAG CAGCTG-3' 3'-primer: 5'-GGGAATTCTCACTTGTCGTCGTCGTC TTGTAG-3'

Expressionsanalyse von Genen der Ratte

<i>Gapdh</i>	5'-primer: 5'-GGGGCCAAAAGGGTCATCATCTCC-3' 3'-primer: 5'-GCCGCCTGCTTCACCACCTTCTT-3'
--------------	---

2.3.2 Primer für die Klonierung

A. pEYK3.1 Primer“ zur Amplifikation retroviral infizierter DNA aus gDNA

5'-Primer 5'-primer: 5'-CAC CCC CAC CGC CCT CAA GTA G -3'

3'-Primer 3'-primer: 5'-TTAGTT CCT CAC CTT GTC GTA TTA T -3

B. Primer zur Klonierung von cDNA-Sequenzen in Plasmid-DNA

14.3.3eta 5'-primer: 5'-CGG GAT CCA CCA TGG GGG ACC GGG AGC
AGC TG-3'

14.3.3eta Flag 3'-primer: 5'-GGG AAT TCT CAC TTG TCG TCG TCG TCC
TTG TAG TCG TTG CCT TCT CCT GCT TCT TC-3'

2.3.3 Primer für *in vitro* Mutagenese von Miz-1

pSer-Asp Primer S428D

5' primer 5`-TAC TGC GGC CGC TCC TTC GAT GAC CCC ACT TCC AAG
ATG CGC-3'

3' primer: 5'-GCG CAT CTT GGA AGT GGG GTC ATC GAA GGA GCG
GCC GCA GTA-3'

pSer-Ala Primer S428A

5' primer: 5`-TAC TGC GGC CGC TCC TTC GCA GAC CCC ACT TCC AAG
ATG CGC-3'

3' primer: 5'-GCG CAT CTT GGA AGT GGG GTC TGC GAA GGA GCG
GCC GCA GTA-3'

Arg-Ala Primer R425A

5' primer: 5`-TAC TGC GGC GCA TCC TTC TCC GAC CCC ACT TCC AAG
ATG CGC-3'

3' primer: 5'-GCG CAT CTT GGA AGT GGG GTC GGA GAA GGA TGC
GCC GCA GTA-3'

Ser-Leu Primer S426L

5' primer: 5`-TAC TGC GGC CGC CTG TTC TCC GAC CCC ACT TCC AAG
ATG CGC-3'

3'primer: 5'-GCG CAT CTT GGA AGT GGG GTC GGA GAA CAG GCG
GCC GCA GTA-3'

Thr-Ala Primer T291A

5'primer: 5'-GGC CTG CGC TCA GGC GCA TAC GGC GAC CGC-3'

3'primer: 5'-GCG GTC GCC GTA TGC GCC TGA GCG CAG GCC-3'

Thr-Glu Primer T291E

5'primer: 5'-GGC CTG CGC TCA GGC GAG TAC GGC GAC CGC-3'

3'primer: 5'-GCG GTC GCC GTA CTC GCC TGA GCG CAG GCC-3'

2.3.4 Oligonukleotide für Oligonukleotid-Pulldown

p15 Initiator, vorwärts:

Biotin-5' - CTA GTT CTT TCG CGG CTG GCT CCC CAC TCT GCC AGA
GCG AGG CGG GG -3'

p15 Initiator, rückwärts:

Biotin-5' - GAT CAA GAA AGC GCC GTC CGA GGG GTG AGA CGG
TCT CGC TCC GCC CC -3'

2.4 Plasmide

2.4.1 Grundvektoren

pcDNA3

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

pcDNA3.1 (-)

Eukaryontischer Expressionsvektor (Invitrogen) mit reverser Orientierung der „multiple cloning site“

pUHD10.1

Eukaryontischer Expressionsvektor mit CMV (Cytomegalievirus) Promotor

pBABE

Vektoren für die Herstellung rekombinanter Retroviren im BOSC/ Phoenix System mit zusätzlichen Resistenzgenen gegen Puromycin oder Hygromycin (Morgenstern und Land, 1990)

pEYK.3.1

Vektor für die Herstellung rekombinanter Retroviren im Phoenix System und die Expression retroviraler cDNA Bibliotheken (George Daley, Whitehead Institute, Cambridge, MA)

pGEX4T3

Vektor zur Herstellung eines GST-Fusionsproteins im bakteriellen System. Die Expression erfolgt nach IPTG-Induktion.

2.4.2 Expressionsplasmide

pcDNA3-Myc

pcDNA3 Vektor mit humaner c-Myc cDNA. Die cDNA stammt aus pBluescript KS-Myc

CMV-Myc

pUHD 10.1 Vektor mit humaner c-Myc cDNA (Philipp et al., 1994)

pcDNA3-14-3-3eta Flag

pcDNA3 Vektor mit humaner 14-3-3eta cDNA. Die cDNA stammt aus pLib-14-3-3eta

pCDNA3-14-3-3sigma

pcDNA3 Vektor mit humaner 14-3-3sigma cDNA (freundlicherweise von Heiko Hermeking zur Verfügung gestellt).

pSPORT6 14-3-3theta

pcDNA3 Vektor mit humaner 14-3-3theta cDNA (RZPD)

pSPORT6 14-3-3gamma

pcDNA3 Vektor mit humaner 14-3-3gamma cDNA (RZPD)

pWLZ-Myr-Akt

pcDNA3 Vektor mit humaner Akt cDNA, die ein Myristilationsignal traegt. Diese modifizierte Akt-Sequenz wirkt konstitutiv aktiv.(freundlicherweise von William Hahn zur Verfügung gestellt)

pWLZ-ER-Akt

pcDNA3 Vektor mit einem Estrogenrezeptor-Akt Fusionsprotein. Die Expression wird über 4-Hydroxy-Tamoxifen induziert (freundlicherweise von Brian Hemmings zur Verfügung gestellt).

pGEX4T3-Miz-1

Vektor mit einer humanen Miz-1 cDNA Sequenz die C-terminal an eine GST-Domaene fusioniert ist.

pGEX4T3-Miz-1 S428A

Vektor mit einer humanen Miz-1 cDNA Sequenz die C-terminal an eine GST-Domaene fusioniert ist.

pGEX4T3-Miz-1 S428A/T291A

Vektor mit einer humanen Miz-1 cDNA Sequenz die C-terminal an eine GST-Domaene fusioniert ist.

CMV-Miz-1

pUHD 10.1 Vektor mit humaner Miz-1 cDNA

(freundlicherweise von Karen Peukert zur Verfügung gestellt)

pcDNA3-Miz-1

pcDNA3 Vektor mit humaner Miz-1 cDNA. Die cDNA stammt aus pUHD-Miz-1 (freundlicherweise von Peter Staller zur Verfügung gestellt)

2.4.2.1 Expressionsvektoren für Punktmutanten von Miz-1

pUHD-Miz-1 S428D

pUHD 10.1 Vektor mit humaner Miz-1 cDNA, die Punktmutation an Position S428D enthaelt.

pUHD-Miz-1 S428A

pUHD 10.1 Vektor mit humaner Miz-1 cDNA, die Punktmutation an Position S428A enthaelt.

pUHD-Miz-1 R425A

pUHD 10.1 Vektor mit humaner Miz-1 cDNA, die Punktmutation an Position R425A enthaelt.

pUHD-Miz-1 S426L

pUHD 10.1 Vektor mit humaner Miz-1 cDNA, die Punktmutation an Position S426L enthaelt.

pUHD-Miz-1 T291A

pUHD 10.1 Vektor mit humaner Miz-1 cDNA, die Punktmutation an Position T291A enthaelt.

pUHD-Miz-1 T291E

pUHD 10.1 Vektor mit humaner Miz-1 cDNA, die Punktmutation an Position T291E enthaelt.

2.4.3 Expressionsplasmide zur Erzeugung rekombinanter Retroviren

pBABE-Puro-Myc

pBABE-Puro Vektor mit humaner c-Myc cDNA

pBABE-Hygro-Miz-1

pBABE-Hygro Vektor mit humaner Miz-1 cDNA

(freundlicherweise von Karen Peukert zur Verfügung gestellt)

pLIB-14.3.3eta

pLib Vektor mit humaner 14.3.3eta cDNA

pBABE-Puro-14.3.3eta (Flag-Tag)

pBABE-Puro Vektor mit humaner 14.3.3eta cDNA, Flag-Tag am C-Terminus

2.4.4 Reporterplasmide

pGL2-hp15

Vektor mit dem Luziferase-Reportergen und einem Fragment des humanen *p15^{INK4B}* Promotors, das die Nukleotide von Position -2500 bis +160 relativ zum Transkriptionsstart umfasst.

10-Luc

Vektor mit einem Luziferase-Reportergen und einem Fragment des humanen *p21^{CIP1}* Promotors, das die Nukleotide von Position -94 bis +16 relativ zum Transkriptionsstart umfasst (freundlicherweise von Dr.W. El-Deiry, Philadelphia, zur Verfügung gestellt; Zeng et al., 1997)

CMV- β -Gal

Vektor für die Expression von β -Galaktosidase in eukaryontischen Zellen (freundlicherweise von Stefan Gaubatz zur Verfügung gestellt)

2.5 Retrovirale cDNA-Expressionsbibliothek

cDNA Expressionsbibliothek gewonnen aus humanen Erythrozyten-Zelllinie K562 (George Daley, Whitehead Institute, Cambridge, MA)

Titer	$\geq 10^6$ cfu (DH10B)/ ml in LB-Medium
Klonierungsvektor	pEYK3.1
Klonierschnittstelle	EcoRI
Selektionsmarker	Zeocin (50 μ g/ ml)
mRNA Quelle	vollständiges Genom der humanen Erythrozyten-Zelllinie K562
Titer rekombinanter	
Virusüberstand	10^6 IFU/ ml
cDNA Größe	1- > 5 k

2.6 Lösungen

2.6.1 Lösungen für die Zellkultur

4-Hydroxytamoxifen	Stocklsg. 1mM in Ethanol; Endkonz. 250nM (Sigma)
PBS pH7.4	130mM NaCl 3mM KCl 6,4mM NaH ₂ PO ₄ ad pH7,4 mit HCl eingestellt
Trypsin/EDTA	Invitrogen, 1x Trypsin/EDTA Lösung; gebrauchsfertig
DMSO	Dimethylsulfoxid 100% (Merck,)
Hygromycin B	Calbiochem, Stocklösung 397mg/ml
Puromycin	Sigma, Stocklösung 20mg/ml

2.6.2 Allgemeine Lösungen

Acrylamidstammlösung	30% (w/v) Acrylamid (Applichem) 0,8% (w/v) N,N'-Methylen-bisacrylamid in H ₂ O Lagerung: 4° C, lichtgeschützt
APS	100g/L Ammoniumpersulfat in H ₂ O dest.
β-Gal Substratlösung	6mg/ml ONPG in H ₂ O
Blocklösung (Western-Blot)	3-5% (w/v) Magermilchpulver (Merck) in TBS-T
Blocklösung (Immunfluoreszenz)	5% (v/v) FCS / 0,1% (v/v) NP-40 in PBS

Material

Bradford Reagenz	0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma) 4,75% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Ortho-Phosphorsäure in H ₂ O; filtrieren, lichtgeschützt lagern
BSA	FraktionV (AppliChem) für die IP: 20% (w/v) in NP-40 Lysepuffer als Referenzlösung: 1µg/µl in NP-40 Lysepuffer
DAPI	4,6-Damidino-2-Phenylindol (Sigma) Stocklösung 5mg/ml
5x Denhardt's	0,1% Ficoll 0,1% Polyvinylpyrrolidon 0,1% BSA
DEPC-H ₂ O	0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat in H ₂ O 12h 37°C, dann autoklavieren
Desoxynukleosid- Triphosphat (dNTP)	Sigma (100mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
Ethidiumbromid	Roth (Stammlösung 10mg/ml in H ₂ O)
Fixierungslösung (Immunfluoreszenz)	Paraformaldehyd 2% (w/v) in PBS pH 7,4 frisch angesetzt, filtriert
Giemsa-Lösung	Sigma, Gebrauchslösung 1:20 in H ₂ O
Hybridisierungslösung (Northern-Blot)	50% Formamid 1x Denhardt's 5x SSC 50mM NaHPO ₄ pH 6,5 0,1% SDS 10% Dextransulfat 100µg/ml Lachssperma-DNA

Material

	in DEPC-H ₂ O
lineares Polyacrylamid	2% (w/v) Polyacrylamid in H ₂ O dest.
Luziferase- Substratmix	0,2mM D-Luziferin (Appllichem), 25mM Gly-Gly pH 7,8
Mowiol (Einsiegelmedium)	133,3g/L Mowiol 4-88 31% Glycerin 0,1M Tris-HCl pH 8,5
Oligo (dT) ₁₅	Roche (1µg/µl)
Phosphatase Inhibitoren	Sigma, 1:1000 Verdünnung
Polybrene	Sigma (Stammlösung 4mg/ml)
Prähybridisierungslösung (Northern-Blot)	50% Formamid, 5x Denhardt's 5x SSC 50mM NaHPO ₄ pH 6,5 0,1% SDS 100µg/ml Lachssperma-DNA in DEPC-H ₂ O
Protein G-Sepharose	Sigma (Suspension in 20% (v/v) Ethanol / H ₂ O)
Protein A-Sepharose	Sigma (Suspension in 20% (v/v) Ethanol / H ₂ O)
Proteaseinhibitoren	Aprotinin (Roche) 5mg/ ml in PBS pH7,4 Leupeptin (Roche) 5mg/ ml in H ₂ O Phenylmethylsulfonylfluorid (Sigma) 0,2M in Ethanol (alle Proteaseinhibitoren wurden 1:1000 verdünnt eingesetzt)

Material

STE-Lösung 150mM NaCl
 10 mM Tris /HCl pH 8,0
 1mM EDTA pH 8,0

2.7 Puffer

β-Gal-Reaktionspuffer 60mM Na₂HPO₄, pH 8,0
 1mM MgSO₄
 10mM KCl
 50mM 2-Mercaptoethanol

Blotpuffer für
Western-Blot Anodenpuffer I
 10-20% (v/v) Methanol
 300mM Tris-Base

Anodenpuffer II
10-20% (v/v) Methanol
30mM Tris-Base

Kathodenpuffer
10-20% (v/v) Methanol
30mM Tris-Base
40mM ε-Aminocapronsäure

6x DNA-Probenpuffer 40% (w/v) Saccharose
 0,2% (w/v) Bromphenolblau
 0,2% (w/v) Xylenyanol
 10mM EDTA pH 8,0

2x HBS 280mM NaCl
 1,5mM Na₂HPO₄
 50mM Hepes-KOH
 pH 7,05

Kpi-Puffer 100mM K₂HPO₄

Material

pH mit 0,5M KH_2PO_4 auf 7,8 einstellen

Lämmli-Puffer:	125mM Tris-HCl 5% (w/v) Saccharose 2% (w/v) SDS 0,5% (v/v) Glycerin 0,005% (w/v) Bromphenolblau 2% (v/v) β -Mercaptoethanol
Laufpuffer (SDS-Gelelektrophorese)	25mM Tris/HCl pH 8,3 0,2M Glycin 0,1% (w/v) SDS
Luziferase-Reaktionspuffer	2mM ATP pH 7,0 0,1M MgSO_4 25mM Gly-Gly pH 7,8
Lyse Puffer H (Oligonukleotidpulldown)	100mM KCl 10mM HEPES-KOH pH7,9 10% Glycerin 5mM MgCl_2 0,1 % NP-40 1mM DTT Phosphatase und Proteinase Inhibitoren (Sigma)
NP40-Lysepuffer	150mM NaCl 50mM Tris pH8,0 NP-40 1% (v/v)
PBS-Puffer pH 7,4	130 mM NaCl 3mM KCl 6,4mM Na_2HPO_4 1,5mM KH_2PO_4 pH 7,4 mit HCl einstellen

Material

10x RNA-Ladepuffer	50% Glycerin 1mM EDTA pH 8,0 0,25% Bromphenolblau
10x RNA-Laufpuffer	20mM MOPS pH 7,0 80mM Natriumacetat 10mM EDTA
RNA-Probenpuffer	50% deionisiertes Dimethylformamid 20% DEPC-H ₂ O 10% 10x RNA-Laufpuffer 20% Formaldehyd-Lösung (37% in H ₂ O)
20x SSC	3M NaCl 0,3M Na-Citrat pH 7,0 ad 10ml in H ₂ O
STET-Puffer	8% (w/v) Sukrose 0,5% (v/v) Triton x-100 50mM EDTA 50mM Tris-HCl pH 8,0 0,5mg/ml Lysozym
TAE-Puffer	40mM Tris-Acetat 1mM EDTA pH 8,0
20x TBS	1M Tris/HCl pH 7,4 3M NaCl
TBS-T	1x TBS / 0,2% (v/v) Tween-20
TE-Puffer	10mM Tris/HCl 1mM EDTA pH 8,0

2.8 Chemikalien

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

Amersham Pharmacia	Redivue [α - ³² P] dCTP, 250 μ Ci, 10mCi/ml Poly (dI) Poly (dC) Phosphorus-32 (PBS 13-Orthophosphat in waessriger Loesung, pH 4-7) ProbeQuant G-50 Micro Columns,
Calbiochem	NP-40, LY294002, Akt-Inhibitor (11-6-Hydroxymethyl-chiro-inositol2-[(R)-2-Omethyl-O-octadecyrcarbonate], Rapamycin, HygromycinB,
Cayla	Zeocin
Difco	Agar, Bactopeptone, Bactotrypton
Fluka	ATP
Gibco/Invitrogen	TEMED, Streptavidin Agarose, Max Efficiency DH5 α competent cells, Agarose, Penicilin-Streptomycin Lsg., Glutamin-Lsg.
Riedel de Haen	Ethanol, Iso-Propanol, Methanol, NaCl, Formaldehyd 37%
Roth	Tris , Phenol, Phenol / Chloroform, Tween-20, Glycerin Glycin

Sigma Mowiol 4-88, Phosphataseinhibitorcocktail 1,
Proteaseinhibitoren

2.9 Standards und Enzyme

2.9.1 Standards

Molekulargewichtsmarker Full Range Rainbowmarker RPN 800 (Amersham)
Low Range Rainbowmarker RPN 755 (Amersham)
Sea blue Plus2 (Invitrogen)
DNA-Marker 1Kb DNA Ladder 1 μ g/ μ l (GibcoBRL)
RNA-Marker 0,24-9,5Kb RNA Ladder, 1 μ g/ μ l (GibcoBRL)

2.9.2 DNA modifizierende Enzyme

Restriktionsendonukleasen Amersham, Freiburg
Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Alkalische Phosphatase (shrimps) Boehringer, Mannheim (1U/ μ l)
T4-DNA-Ligase Amersham, Freiburg (5U/ μ l)

2.9.3 RNA und DNA verdauende Enzyme

Rnase-freie DNase Promega (1 U/ μ l)
RNase A (Boehringer) Stammlösung 10mg/ml

2.9.4 Polymerasen und Reverse Transkriptasen

Pfu-TurboPolymerase Stratagene (2,5U/ μ l)
RedTaq-Polymerase Sigma (1U/ μ l)
PWO-Polymerase HYBAID-AGS (2,5U/ μ l)
Taq/PWO Polymerase-Mix Roche (3,5U/ μ l), Expand long Template PCR System

2.10 Filme, Filter und Geräte

Filme	ECL Hyperfilm (Amersham) BIOMAX MR Scientific Imaging Film (Kodak)
Blotting-Membran für Proteine	Immobilon-P, PVDF Transfer Membran (Millipore)
Blotting-Membran für RNA	Zetaprobe GT Nylonmembran (Biorad)
Whatman-Filterpapiere	Gel-Blotting Papier (Schleicher und Schuell)

Begasungsbrutschränke, Heraeus BBD 6220,

Biofuge, Heräus Fresco

FACScalibur, Becton-Dickinson

Luminometer, Lumat LB 9507, Berthold

Mikroskop DMIRB, Leica

Mini-Transilluminator, Biorad

Minifuge RF, Heräus

Megafuge 1.OR, Heräus

Primus Thermocycler, MWG

Sterilarbeitsbank, Heraeus HeraSafe

Schüttelinkubatoren Model G25, New Brunswick Scientific Co.INC

Szintillationszähler LS1701, Beckman

Transblot SD Apparatur, Biorad

Ultrospec 2000, Pharmacia

UV-StratalinkerTM-UV-Crosslinker-2400, Stratagene

2.11 Antikörper

2.11.1 Primäre Antikörper

anti Miz1

Monoklonale Mausantikörper (J.

Bartek)

3F3

für Immunpräzipitation

11F4

für Immunpräzipitation

10E2

für Western-Blot, Immunpräzipitation

und

Immunfluoreszenz

anti Miz1

Phospho Ser428
aufgereinigtes

Polyklonale Kanninchenantikörper

affinitätschromatographisch

Kanninchenserum (Eurogentec, Belgien)
für Immunpräzipitation und Western-

Blot

diverse Antikörper

anti- Myc

9E10: monoklonaler Mausantikörper
(Evan et al., 1985); Western-Blot

anti-14-3-3eta

14-3-3eta (Santa Cruz, Santa Cruz, CA),
polyklonaler Kaninchenantikörper,
Western-Blot

anti-14-3-3 parn

polyklonaler Kaninchenantikörper OG-
511 (Upstate); Western-Blot und
Immunpräzipitation

anti-Cdk2

polyklonaler Kaninchenantikörper (Santa
Cruz)

anti-Flag

monoklonaler Mausantikörper M2
(Sigma) für Western-Blot und
Immunpräzipitation

Anti-phospho Akt

Cell signaling, polyklonaler
Kanninchenantikörper, Western-.Blot

2.11.2 Sekundäre Antikörper

anti-Maus-Cy3TM

Affinitätsgereinigter Antikörper (Dianova)
Ziege anti-Maus Immunglobulin

anti-Maus-FITC

Affinitätsgereinigter Antikörper (Dianova)
Ziege anti-Maus Immunglobulin

anti-Kaninchen-HRP

Affinitätsgereinigter Antikörper (Amersham)
Esel anti-Kaninchen Immunglobulin

anti-Maus-HRP

Affinitätsgereinigter Antikörper (Amersham)

Esel anti-Maus Immunglobulin

2.12 Kit-Systeme

DNA-Aufreinigungs- kit	Nucleotrap Kit (Machery-Nagel)
DNA-Isolationskit	QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)
Entwicklerlösungen	ECL Western blotting Detektions-Reagenzien 1 und 2 (Amersham)
Gelfiltrationssäulen	ProbeQuant G-50 Micro Columns (Pharmacia)
<i>In vitro</i> Mutagenese	QuickChange™ Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)
Oligonukleotidaufreinigung	Qiaquick Nukleotide removal kit (Qiagen)
PCR-Kit	Expand long template PCR System (Roche)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen-tip 500 (Qiagen)
RNA-Isolationskit	Qiagen Rneasy (Qiagen)
genom. DNA Isolationskit	Qiagen-QIAmp DNA Kit

3. Methoden

3.1 Zellbiologie

3.1.1 Zellkultur

3.1.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung von eukaryotischen Zellen erfolgte im wesentlichen nach Standardmethoden wie sie z.B. bei Spector (Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1998) beschrieben sind. Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden alle in Adhäsionskultur auf Polystyrol-Zellkulturschalen (Nunc, Greiner) gehalten. Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Zellen in gepuffertem Vollmedium (siehe Material) in Begasungsbrutschränken (Heräus BBD 6220) bei 37°C, 96% relativer Luftfeuchte und 5% CO₂ kultiviert. Um die Zellkulturarbeiten unter sterilen Bedingungen durchzuführen, wurde unter Steril-Arbeitsbänken (Heräus, Hera-Safe) gearbeitet.

3.1.1.2 Passagieren von Zellen

Die verwendeten Zelllinien wurden in Abhängigkeit ihrer Wachstumsrate alle 2-4 Tage im Verhältnis 1:5 bis 1:20 verdünnt und auf neue Kulturschalen ausplattiert. Zum Ablösen der Zellen wurde zuerst das Medium abgenommen und der Zellrasen einmal mit sterilem PBS pH 7,4 gewaschen, um die im Serum enthaltenen Proteaseinhibitoren zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,25% Trypsin/EDTA-Lösung zwischen 1 und 5 Minuten bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen von der Kulturschale gelöst haben. Danach wurden die Zellen in Medium auf die benötigte Zellzahl verdünnt und auf neue Kulturschalen überführt.

3.1.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit einer modifizierten Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm) bestimmt. Die Zellzahl wurde in 25 Feldern ausgezählt und daraus der Mittelwert berechnet. Durch Multiplikation des Mittelwertes mit 1×10^4 erhielt man die Anzahl der Zellen pro ml.

3.1.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Langzeitlagerung eukaryotischer Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die Bildung von mechanisch schädlichen Eiskristallen beim Gefriervorgang zu vermeiden, wurden die Zellen in DMSO haltigem Medium langsam auf Lagertemperatur gebracht. Zunächst wurden kurz vor der Konfluenz stehende Zellen trypsinisiert, in Vollmedium aufgenommen und danach 5 Minuten bei 1000 rpm und RT (Heräus Megafuge OR) zentrifugiert. Das Pellet wurde in Einfriemedium (Kulturmedium der jeweiligen Zelllinie mit 20% FCS und 10% DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspension (ca. 5×10^6 Zellen/ml) wurde in Cryogefäße (2ml, Nunc) abgefüllt und in einer Einfrierbox über Nacht auf -80°C abgekühlt. Danach wurden die Konserven in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden die in Stickstoff tiefgekühlten Zellaliquots direkt in ein auf 37°C erwärmtes Wasserbad überführt und dort aufgetaut bis die Zellsuspension gerade flüssig wurde. Die Zellsuspension wurde in 10 ml Vollmedium gegeben und danach 5 min bei 1000 rpm und RT (Heräus Megafuge OR) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 10 ml Vollmedium resuspendiert und auf eine 10 cm Platte ausgesät.

3.1.1.5 Wachstumskurven

Zur Ermittlung von Zellwachstumsraten wurden auf 6cm Kulturplatten je 5×10^4 ausplattiert. In den folgenden Tagen wurde das Wachstum der Zellen durch Ermittlung der Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden dazu in 1ml Trypsinlösung abgelöst und die Zellzahl in dieser Suspension bestimmt. Die abgelösten Zellen wurden nach dem Zählen verworfen. Zur genauen Bestimmung der Wachstumsrate wurden Triplikate ausgezählt.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Transfektion von Säugerzellen

3.2.1.1 Transiente Transfektion durch Kalziumphosphatpräzipitation

24h vor Transfektion wurden 5×10^5 Zellen auf 10 cm Schalen ausplattiert. 4h vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Die zu transfizierende DNA (max.

30µg) wurde mit 250 mM CaCl₂ (Endkonzentration) in einem Volumen von 1ml gemischt. Anschließend wurde die DNA-CaCl₂-Lösung langsam in das selbe Volumen eines 2x HBS-Puffers unter permanenter Luftzufuhr (Pasteurpipette/Vortexer) getropft. Das gebildete Präzipitat wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 16h Inkubation wurden die Zellkulturen einmal mit PBS gewaschen und frisches Medium zugefügt. Nach weiteren 24h wurden die Zellen für folgende Experimente geerntet oder fixiert.

3.2.1.2 Transiente Transfektion für Reporter Assay

Transiente Transfektionen für Reporter-Assays wurden wie unter 3.2.1.1 beschrieben in unabhängigen Triplikaten mit 3×10^5 Zellen, plattiert auf 6 cm Platten, angesetzt. Dazu wurden pro Kulturschale 3µg Luziferase-Reportervektor und 1-5µg der entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert. Als interner Transfektionsstandard wurden zusätzlich 400ng eines CMV-β-Gal Expressionsvektors kotransfiziert, um die beta-Galaktosidase-Aktivität zu bestimmen.

3.2.1.3 Bestimmung der Luziferaseaktivität

Die transient transfizierten Zellen wurden 36h nach Transfektion mit kaltem PBS/ 1mM DTT gewaschen, mit einem Plastischaber geerntet und in 500µl PBS/ 1mM DTT resuspendiert. Die Zellpelletierung erfolgte für 4 min bei 3000rpm und 4°C (Heraeus-Biofuge fresco). Das Zellpellet wurde in 200µl 0,1M KHPO₄ pH 7,8/ 1mM DTT aufgenommen und durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37°C aufgeschlossen. Durch einen Zentrifugationsschritt bei 13000rpm (Eppendorf Minifuge) für 15min bei 4°C wurde das Proteinlysate von Zellmembranteilen geklärt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 50µl des Überstandes wurden mit 350µl Reaktionspuffer (2mM ATP pH7,0, 0,1M MgSO₄, 25mM Gly-Gly pH7,8) versetzt und die Lichtemission im Luminometer (Lumat LB 9507, Berthold) nach Zugabe von 150µl Substratmix (0,2mM D-Luziferin, 25mM Gly-Gly pH7,8) bestimmt.

3.2.1.3 Bestimmung der beta-Galaktosidaseaktivität

Die β-Galaktosidaseaktivität in den Lysaten von CMV β-Gal kotransfizierten Zellen wurde in einem kolorimetrischen Test gemessen. Dazu wurden 50µl des Zellysates zu 750µl Reaktionspuffer (60mM Na₂HPO₄ pH8,0, 10mM KCl,

50mM 2-Mercaptoethanol) in eine Halbmikroliter-Einmalküvette gegeben. Nach Zugabe von 100 μ l Substratlösung (6mg/ ml ONPG, α -Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid in H₂O) und Mischen wurden die Proben bei 37°C für 2-8 h inkubiert. Die Aktivitätsbestimmung der β -Galaktosidase erfolgte durch Messung der Absorption bei 420 nm.

3.2.2 Retrovirale Infektion zur Integration von Plasmid-DNA

3.2.2.1 Herstellung rekombinanter Retroviren

Zur stabilen Integration von Plasmid DNA in das Genom von Säugerzellen wurde die retrovirale Gentransfertechnik (Pear *et al.*, 1993) angewandt. Als Vektoren dienten entweder Plasmide der pBABE-Gruppe (Morgenstern und Land, 1990), in welche die entsprechenden cDNA Sequenzen kloniert wurden oder pMXsubF-Vektoren (Koh *et al.*, 2002) die cDNA-Sequenzen einer humanen K562-Erythrozytenleukämie Expressionsbibliothek (Berns *et al.*, 2000) trugen. Die Plasmide wurden in Bakterien amplifiziert und in präparativem Maßstab isoliert.

Zur Transfektion der Phoenix-*Packaging*-Zelllinie wurden 24h vor Transfektionsbeginn 2×10^6 Zellen auf einer 10cm Kulturschale plattiert. 4h vor Transfektion wurde das Medium gewechselt. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe der Kalziumphosphat-Methode (s. 3.2.1.1) und es wurden 30 μ g DNA pro Transfektionsansatz benutzt. 12-14h nach Transfektion wurden die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen und 6 ml neues Medium zugegeben. Nach weiteren 24h wurde der die Viren enthaltende Überstand abgenommen und durch einen Sterilfilter mit 0,45 μ m Porengröße auf Eis filtriert (1.Ernte). Anschließend wurde der Virusüberstand entweder direkt zur Infektion eingestzt oder in Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Phönix-Zellen erhielten 6ml neues Medium und nach weiteren 16h wurde der zweite Überstand geerntet (2.Ernte).

Die Herstellung rekombinanter Expressionsbibliotheks-Viren erfolgte in größerem Maßstab. Zur Transfektion wurden 10×10^6 Zellen der Phoenix-*Packaging*-Zelllinie auf 15 cm Kulturschalen plattiert. Die transfizierte DNA-Menge betrug pro Platte 40 μ g, wobei ein H2B-GFP Expressionsplasmid im Verhältnis 1:100 als Transfektionskontrolle kotransfiziert wurde. Der 1. abgenommene Virusüberstand wurde über Nacht auf Eis bei 4°C gelagert und nach 16h mit dem zweiten Virenüberstand gemischt.

3.2.2.2 Infektion von Zellen mit rekombinanten Retroviren

24h vor der Infektion wurden 5×10^5 Zellen auf 10 cm Kulturschalen plattiert. Zur Infektion wurden die Zellen mit 3ml des ersten oder 4ml des 2. viralen Überstandes eingesetzt. Zusätzlich wurde das Volumen auf 5ml mit Vollmedium aufgefüllt und zur Erhöhung der Infektionseffizienz wurden $4 \mu\text{g/ml}$ Polybrene (Hexadimethrinbromid, Sigma) zu den Zellen gegeben. Nach 12-16h wurde das virushaltige Medium mit 5ml Vollmedium verdünnt. 48h nach Infektionsbeginn wurde mit der Selektion der infizierten Zellen begonnen.

Zur Doppelinfektion (Superinfektion) von Zellen mit rekombinanten Viren die unterschiedliche cDNA Sequenzen exprimieren, wurden die Zellen 24h nach der ersten Infektion mit Trypsin abgelöst und im Verhältnis von 1:3 auf neue 10 cm Kulturschalen plattiert. 48h nach Erstinfektion wurden die Zellen erneut mit Retroviren superinfiziert. Mit der Selektion wurde 72h nach der ersten Infektion begonnen.

3.2.3 Selektion Antibiotikum-resistenter Zellen

Zur stabilen Integration von rekombinanten Retroviren bzw. transfizierter DNA wurden die Zellen 48h nach Infektion bzw. Transfektion in Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt (Konzentrationen s. Tab. 1). Je nach Experiment wurde dazu das Selektionsmedium direkt auf die Zellen gegeben oder die Zellen wurden trypsinisiert und in das Selektionsmedium passagiert. Die Vollständigkeit der Selektion konnte mit Zellen, denen das jeweilige Resistenzgen fehlte, überprüft werden.

ZELLINIE	PUROMYCIN	HYGROMYCIN
Rat1 Fibroblasten	$5 \mu\text{g/ml}$	$200 \mu\text{g/ml}$
Ls174T	$2 \mu\text{g/ml}$	$150 \mu\text{g/ml}$

Tabelle 1: Endkonzentrationen der für die angegebenen Zelllinien verwendeten Selektions-Antibiotika

3.2.4 Koloniebildung

Die mit rekombinanten Retroviren infizierten Zellen wurden 48h nach erfolgter Infektion trypsinisiert und im Verhältnis 1:3, 1:5 oder 1:10 in das entsprechende Selektionsmedium auf 10cm Kulturschalen plattiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle

3-4 Tage. Die gewachsenen Kolonien wurden entweder isoliert und expandiert oder mit 70% (v/v) Ethanol fixiert und mit Giemsa-Lösung (Sigma) nach Herstellerangaben für 45 min gefärbt.

3.2.5 Hormoninduktion der Akt-ER Chimäre

NIH3T3 Zellen wurden mit einer Akt-ER Chimäre infiziert. Die Aktivität des Akt-ER Proteins wurde durch Hormonzugabe induziert. Dazu wurden dem Kulturmedium 200nM des Östrogenanalogons 4 Hydroxy-Tamoxifen zugegeben und die Zellen 5-6 h darin kultiviert.

3.2.6 Behandlung von Zellen mit verschiedenen Kinaseinhibitoren

Um Phosphorylierungsstudien durchzuführen wurden verschiedene synthetische Inhibitoren eingesetzt, die spezifisch bestimmte Kinasen hemmen. In diesen Versuchsansätzen wurden Ls174T oder NIH3T3 Zellen zuerst 3 Tage Serum gehungert, danach jeweils 1h mit dem entsprechenden Kinaseinhibitor (eingesetzte Konzentrationen und Lösungsmittel s. Tab. 2) vorinkubiert und anschließend für 1-6h mit Serum restimuliert. Die so behandelten Zellen wurden nach den gewünschten Zeitpunkten für Immunpräzipitationen und Westernblotanalysen geerntet .

SPEZIFISCHER KINASEINHIBITOR	ZU HEMMENDE KINASE	KONZEN-TRATION (μ M)	LÖSUNGS-MITTEL
LY294002	Phosphatidyl - inositol 3 kinase (PI3K)	50	DMSO
Rapamycin	mTor	0,1	DMSO
1L-6-Hydroxymethyl-chiro-inositol2(R)-2-O-methyl-O-octadecycarbonate	Akt (PKB)	50	DMSO

Tabelle 2: Konzentrations- und Lösungsmittelangaben für die eingesetzten Kinaseinhibitoren

3.2.7 Radioaktive Makierung von Phospho-Proteinen mit Phosphor-32 *in vivo*

Dieses Verfahren wurde eingesetzt, um die Akt abhängige Phosphorylierung der Miz1 Proteine physiologisch *in vivo* zu analysieren.

Dazu wurden 5×10^5 Akt-Er exprimierende NIH3T3 Zellen auf 10cm Kulturschalen ausplattiert. 24h Stunden später wurde das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen und 10ml Hungermedium (phosphatfreies DMEM mit 1% CFS) für 48h hinzugegeben, um die Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus zu synchronisieren und ihnen Phosphat zu entziehen. Nach 48h wurden die Zellen mit 10% Serum restimuliert und für 6h mit radioaktivem Phosphor-32 in einer Konzentration von 1mCi/ ml markiert. Ein Teil der Zellen wurde gleichzeitig mit 200nM 4-OHT induziert, um die Akt-ER Chimäre zu aktivieren. Die Zellen wurden dabei wie unter 3.1.1.1 angegeben im Brutschrank gehalten. Nach 6h Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen, die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers geerntet, 10' bei 1000rpm (Heraeus Minifuge RF) und RT pelletiert und das Pellet in NP-40 Lyse-Puffer resuspendiert. Mittels Gefrier-Auftau-Technik (s. 3.4.2) wurden die Zellen aufgeschlossen und die Proteinkonzentration mittels Bradfordmethode bestimmt. 300µg Gesamtprotein wurden jeweils dem phosphospezifischen S428-Miz1 Antikörper oder dem Miz1 spezifischen 10E2 Antikörper immunpräzipitiert und auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die Analyse erfolgte mittels Autoradiogramm.

3.3 Retroviraler Screen einer humanen cDNA Expressionsbibliothek

3.3.1 Primärer Screen

3.3.1.1 Aufbereitung der cDNA Expressionsbibliothek

Die in Ethanol präzipitierten Expressionsplasmide wurden bei 13000 rpm (Heraeus Biofuge fresco) 30min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in 70% Ethanol gewaschen und erneut 30min bei 13000 rpm (Heraeus Biofuge fresco) und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert und in Aliquots bei -20°C gelagert.

3.3.1.2 Amplifikation der Expressionsbibliothek in Bakterien

Für die Amplifikation der Expressionsbibliothek wurde zuerst die tatsächliche Transformationsrate des eingesetzten Bakterienstammes DH5 α (superkompetent, Invitrogen) mittels Verdünnungsreihen ermittelt, um ungefähr 30000 Kolonien/ 15cm LB-Ampicillin Platten zu erhalten. Damit sollte eine einheitliche Amplifikation der verschieden großen cDNA-Fragmente (1 kb bis >5 kb) gewährleistet werden.

Die Transformation erfolgte mit 100 μ l DH5 α Bakterienkultur und jeweils 30ng der cDNA tragenden Expressionsplasmide. Die Kulturen wurden zunächst mit der DNA 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur effizienten Aufnahme der DNA durch die Bakterienmembran wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 45 sec und eine zweiminütige Inkubation auf Eis durchgeführt. Anschließend wurden 500 μ l LB-Medium zu den Kulturen gegeben und 45 min bei 37°C auf einem Schüttler vorkultiviert. Die vorkultivierten Bakterienkulturen wurden entsprechend verdünnt, auf 15cm LB-Amp Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden 10 ml LB-Amp auf die Agarplatten gegeben und die Bakterienkolonien mit einem Plastikzellschaber abgeschabt. Die geernteten Bakterien wurden nochmals 1 h bei 37°C in einem Schüttler weiterinkubiert, bevor die Expressionsplasmide isoliert wurden mit Hilfe eines Quiagen Plasmid Maxi Kits.

3.3.1.3 Infektion von Zellen mit cDNA-Expressionsbibliothek-Retroviren

Zur Isolierung von Proteinen, die die wachstumsinhibitorische Funktion von Miz-1 überkommen, wurden 5×10^5 Rat1-Fibroblasten-Zellen ausplattiert. Diese wurden bei 50% Konfluenz mit einer retroviralen cDNA-Expressionsbibliothek (Koh *et al.*, 2002), die wie unter 3.3.1.1 beschrieben aufbereitet wurde, infiziert. Dazu wurden 4 ml des Virusüberstandes eingesetzt und die Zellen über Nacht oder zur Kontrolle mit einem pBabe-Puro Virus.

3.3.1.4 Superinfektion von cDNA-Bank exprimierenden Zellen

24h nach Infektion der Rat1-Fibroblastenzellen mit der cDNA-Expressionsbibliothek Retroviren oder pBabe-Puro Retroviren wurden diese trypsinisiert und im Verhältnis 1:3 auf neue 10cm Kulturschalen ausgesät. Nach weiteren 24h erfolgte die Superinfektion mit Miz-1/Hygro Viren wie unter 3.2.2.2 beschrieben.

3.3.1.5 Koloniebildung

40h nach der Superinfektion wurden die Fibroblastenzellen zur Selektion im Verhältnis 1:2 auf 10cm Kulturschalen in Hygromycin-haltiges Medium (Konzentration s. Tab1) gesplittet.

Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage. Nach zehn bis zwölf Tagen wurde ein Teil der Zellen mit 70% (v/v) Ethanol fixiert und mit Giemsa-Lösung (Sigma) nach Herstellerangaben für 45 min gefärbt. Der andere Teil wurde benutzt, um die entstehenden Klone zu isolieren und fuer deren Analyse zu expandieren.

3.3.1.6 Isolierung retroviral infizierter cDNA-Sequenzen

Die genomische DNA von Zellpools, die durch retrovirale Infektion einer cDNA Bibliothek ein Gen erworben haben, dessen Expression den Miz1 induzierten Phänotyp (langsame Wachstumsrate) überwinden konnte, wurde isoliert. Mittels pEYK 3.1 Vektor spezifischen Primern wurden die retroviralen cDNA Insertionen isoliert und amplifiziert. Die PCR Fragmente wurden auf einem Agarosegel analysiert, aufgereinigt und zur Identifizierung sequenziert (Seqlab, Göttingen). Die Identität der erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe des Blast Programms bestimmt.

3.3.2 Sekundärer Screen

3.3.2.1 Herstellung Replikations-kompetenter MoMuLV Viren

Eine MoMuLV produzierende Zelllinie wurde auf 15cm Kulturschalen ausplattiert und mit 15 ml Medium versetzt, in welches die Viren direkt von den Zellen abgegeben wurden. Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 70-80% erreichten, wurde der virushaltige Überstand abgenommen und durch einen Sterilfilter mit 0,45 µm Porengröße filtriert. Der Überstand wurde direkt zur Infektion eingesetzt.

3.3.2.2 Mobilisierung retroviral infizierter cDNA-Sequenzen mit MoMuLV

Zur Überprüfung, ob ein neu erworbener Phänotyp von Zellen (hier: erhöhte Zellwachstumsrate durch Inhibition der Funktion von Miz1) spezifisch durch eine retrovirale Insertion einer bestimmten cDNA-Sequenz verursacht worden war, wurden 5×10^5 dieser Zellen auf eine 10cm Kulturschale plattiert und 24h später mit 10 ml MoMuLV Viren haltigem Überstand und Polybrene (4µg/ ml) versetzt. Die Zellen

wurden dann für 48 h bei 37°C inkubiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Dann wurde 10 ml neues Medium auf die Zellen gegeben. Während einer weiteren Inkubation von 24h gaben die Zellen neue MoMuLV Viren in das Medium ab. Diese Viren hatten zuvor sämtliche genomisch integrierte retrovirale Sequenzen (retrovirale Bibliotheks-Sequenzen) in ihr eigenes Erbgut eingebaut. Das virushaltige Medium wurde sterilfiltriert (0,45 µM) und sofort zur Infektion von Rat1 Fibroblastenzellen eingesetzt, die 24h vorher mit einer Zellzahl von 5×10^5 auf 10cm Kulturplatten ausplattiert worden war. Mit diesem virushaltigem Medium und Polybrene (4µg/ ml) wurden die Zellen 48h inkubiert und dann mit Hygromycin selektioniert. Die erhaltenen Zellklone wurden fixiert und Giemsa gefärbt.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Herstellung von Proteinlysaten

3.4.1.1 Herstellung von Proteinlysaten durch Ultraschallbehandlung

10×10^6 Zellen wurden in kaltem PBS pH 7,4 abgeschabt, pelletiert (1000 rpm, 10 min, 4°C, Heräus Minifuge RF) geerntet, in 1ml Lyse-Puffer H (10 mM Hepes-KOH pH 7,5, 100 mM KCl, 5mM MgCl₂, 10% Glycerin, 0,1% NP-40, 1mM DTT, 10 mM NaF, 20mM Bisphosphglycerat, 5µg/ ml Aprotinin, 1µg/ ml Leupeptin, 0,2 mM PMSF) resuspendiert und sonifiziert. Die Sonification der Zellsuspension erfolgte in 4 Intervallen à 10Sec mit einer Mikrospritze und 10% Amplitudenstärke (Branson). Zwischen den Intervallen lag jeweils 1min Pause und die Proben wurden die gesamte Zeit in Eiswasser gekühlt. Das Zelllysat wurde anschließend durch 20 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C geklärt. Der das Gesamtprotein enthaltene Überstand wurde für Immunpräzipitationen, Western-Blotanalysen und Oligonukleotid-Pulldown- Experimente eingesetzt.

3.4.1.2 Herstellung von Proteinlysaten mittels Gefrier-Auftau Technik

5×10^6 Zellen wurden in kaltem PBS pH 7,4 abgeschabt, pelletiert (1000 rpm, 10 min, 4°C, Heräus Megafuge OR) und das Pellet in 300µl NP-40 Lyse-Puffer (Endlkonz. 1% (v/v)) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zur stärkeren Lyse dreimal in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend im Wasserbad bei 37°C wieder

aufgetaut. Der Proteinhaltige Überstand wurde durch 20 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm (Heräus Minifuge RF) bei 4°C geklärt

3.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellysaten wurde nach der von Bradford beschriebenen Methode (Harlow und Lane, 1988) durchgeführt.

3.4.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte wenn nicht anders angegeben in 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen (modifiziert nach Laemmli, 1970) in einem System mit vertikal ausgerichteten Glasplatten (Größe der Glasplatten: 16 cm x18 cm, 1 mm Spacer; Eigenbau, Technikabteilung, Universität Marburg) oder BIO-RAD MiniProtean II/III Apparatur. Die 16 cm x 18 cm großen SDS-Polyacrylamidgele enthielten im Trenngel einen T/C Gehalt von 10,3%/ 5,6% , 375 mM Tris-HCl pH 8,8 und 0,1% SDS. In den Sammelgelen betrug der T/C Gehalt 4,8%/ 2,6%, 70 mM Tris-HCl (pH6,8) und 0,1% SDS. Die Polymerisation in den Trenn- und Sammelgelen wurde durch 0,1% (v/v) APS und 0,1% (v/v) TEMED erreicht. Die SDS-Gele für die MiniProtean Apparatur enthalten im Trenngel einen T/C Gehalt von 10%/ 3% und im Sammelgel von 3,9%/ 2,6%. Die Polymerisierungszeiten für die Trenngele betragen 20 min und die der Sammelgele 45 min. Der für die Elektrophorese eingesetzte Laufpuffer enthielt 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 0,2 M Glycin und 0,1% (w/v) SDS. Zur Vorbereitung der Proteinproben wurden diese mit 25% ihres Volumens an 5x Lämmli-Puffer versetzt und 1 min bei 95°C erhitzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bis zum Übergang ins Trenngel bei 150 mA (konstant) und wurde anschließend auf max. 300 mA erhöht. Als Größenmarker diente der "Seablue"-Standard (250-4 kDa, Invitrogen).

3.4.4 Analyse von Proteinen durch Westernblot-Verfahren

3.4.4.1 Semidryblot

Diese Methode funktioniert mit dem Gel-Membran-Sandwich zwischen horizontalen Plattenelektroden und heißt deshalb *Semi-Dry*, weil die Puffermenge auf getränkte Filterpapiere zwischen den Elektroden und dem Transfersandwich begrenzt ist.

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mittels Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran (Millipore) überführt zur anschließenden Immundetektion. Hierzu wurde das Semidry-Verfahren nach Kyse-Andersen (1984) angewandt. Es wurde ein Drei-Puffersystem (Anode I-, Anode II- und Kathodenpuffer) eingesetzt, wobei den Transferpuffern jeweils 10% Methanol für Proteine >50 kDa und 20% bei Proteinen \leq 50 kDa zugesetzt wurde. Die hydrophobe PVDF-Membran wurde zunächst mit Methanol benetzt, anschließend mit dest. Wasser gespült und 15 min. im Kathodenpuffer inkubiert, um eine gute Benetzbarkeit zu erzielen. Die 3x3 Filterpapiere (Whatman, Schleicher & Schuell) wurden vor dem Auflegen mit Blotpuffer getränkt, jeweils 3 Papiere pro Puffertyp. Der Transfer erfolgte in einer Transblot® SDApparatur (BIO-RAD) bei 1,2 mA/ cm² für 60-70 min wobei die Spannung 25V nicht überschritten wurde.

3.4.4.2 Tankblot

Das Tankblot Verfahren wurde zum Elektrotransfer von Proteinen höherer Molekularmassen eingesetzt. Der hierbei verwandte Blotpuffer setzte sich aus 25 mM Trisbase, 192 mM Glycin, 10% Methanol und 0,03% SDS zusammen. Die Membran wurde wie unter 2.4.5.2 beschrieben vorbehandelt und auch die 4-6 Filterpapiere (Whatman, Schleicher & Schuell) wurden zuvor mit Transferpuffer getränkt. Der Blotvorgang erfolgte bei 10 V und maximal 100 mA für 1,5-2 h bei 4°C in einer Transblotapparatur (Trans-Blot, BIO-RAD).

3.4.5 Immundetektion von spezifischen Proteinen

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran nach dem Blotvorgang in 3-5% Magermilch/ TBS-T Puffer für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler. Die Verdünnung der Primärantikörper entsprach bei Standardantikörpern 1:1000 in 3-5% Magermilch/ TBS-T. Nach 3 Waschstritten für je 10 min mit TBS-T Puffer, wurde die Membran für 45 min bei RT unter Schütteln mit dem entsprechenden Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper behandelt. Die Sekundärantikörper wurden standardmäßig 1:3000 in 3-5% Magermilch/ TBS-T verdünnt. Nach viermaligem Waschen für je 10 min mit TBS-T wurden die Proteinbanden mit Hilfe des ECL-Plus oder ECL- Systems (Amersham) auf Hyperfilm (Amersham) detektiert.

3.4.6 Immunpräzipitation

Zur Analyse der *in vivo* Interaktion von Proteinen wurde Immunpräzipitationen durchgeführt. Hierzu wurden Zellen wie unter 3.4.1 beschrieben lysiert und mit einem proteinspezifischen immobilisierten Antikörper inkubiert.

Für die Immunpräzipitation wurde die benötigte Menge Protein G-Sepharose in dem entsprechenden Lyse-Puffer äquilibriert. Anschließend wurde die Protein G Sepharose mit 2% (w/v) BSA in Lyse-Puffer zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Um unspezifisch bindende Proteine aus dem Proteinlysat zu entfernen wurde das Lysat (1 ml) mit 60 µl der abgesättigten G-Sepharose für 1 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurde die G-Sepharose durch Zentrifugation vom gereinigten Lysat getrennt.

Parallel erfolgte die Kopplung von 5µg der entsprechenden Antikörper an 60 µl Protein G-Sepharose auf einem Überkopfschüttler bei 4°C für mindestens 1h. Die ungebundenen Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen entfernt. Anschließend wurde das gereinigte Lysat (1 ml) zu der pelletierten, antikörpergekoppelten G-Sepharose pipetiert und mit 2% BSA (w/v) Endkonzentration versetzt. Die Immunpräzipitation erfolgte über Nacht auf einem Überkopfschüttler bei 4°C. Das nach Zentrifugation erhaltene Protein G-Sepharose Pellet wurde viermal mit Lyse-Puffer gewaschen, dann das letzte Pellet in 80 µl 2x Lämmli-Puffer aufgenommen und 5 min bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden anschließend mittels Western-Blot Verfahren analysiert.

3.4.7 Bakterielle Expression von rekombinanten Proteinen und deren Aufreinigung

Die für das jeweilige Protein kodierende cDNA wurden im fortlaufenden Leserahmen mit der DNA-Sequenz für das Glutathion-S-Transferasegen in den pGEX4T3-Expressionsvektor kloniert. Diese Vektoren besitzen einen IPTG induzierbaren *tac*-Promotor.

DH5α Bakterien wurden mit den klonierten GST-Fusionsprotein-Expressionsplasmiden transformiert und auf LB-Amp Platten ausgestrichen. Am Folgetag wurde eine Einzelkolonie gepickt und als Vorkultur in 50ml LB-Amp (100 µg/ ml) über Nacht bei 30°C im Schüttler kultiviert. 25 ml dieser Vorkultur wurden in 400 ml frisches 30°C warmes LB-Amp Medium gegeben und weiter unter Schütteln bei 30°C kultiviert bis

die Zellen eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht hatten. Dann wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,5 mM IPTG für 4 h induziert.

Zur Proteinaufreinigung wurden die Bakterienzellen pelletiert durch Zentrifugation für 15 min bei 4000rpm (Heräus Megafuge OR) und RT. Das Pellet wurde in 20 ml NETN Puffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF) resuspendiert und die Zellen mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen (Branson, Intervalle 4x 30 sec, 20% Amplitude, auf Eis). Das Lysat wurde durch 30 min Zentrifugation bei 15000 rpm im SS-34 Rotor geklärt. Dem Überstand wurde 1 ml in NETN Puffer äquilibrierte Glutathion-Sepharose (Sigma) zugegeben und 1h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharose wurde anschließend dreimal mit NETN Puffer gewaschen und die GST-Proteine mit 1 ml Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,15% (w/v) Glutathion) eluiert. Nach zweimaliger Dialyse gegen je 1L Elutionspuffer ohne Glutathion wurden die Proteine aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.4.8 Indirekte Immunfluoreszenz

Es wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen (\varnothing 15mm, Stärke 1,15mm) in 6 cm Schalen mit je 3 Deckgläschen ausgesät. 24h später wurden die Zellen wie unter 2.2.1 beschrieben transfiziert. 40h nach Transfektion wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend 10 min bei RT mit 2% (w/v) Paraformaldehydlösung fixiert. Zum Neutralisieren des Paraformaldehyds wurden die Zellen zweimal 5 min mit 0,1 M Glycin in 1x PBS gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte im Anschluß durch zweimalige Inkubation für je 10 min mit 0,5% (v/v) NP-40 in 1x PBS. Um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern wurden die Zellen für 45 min bei 37°C mit einer Blocklösung (0,5% (v/v) NP-40, 5% FCS in 1x PBS) behandelt.

Zur Antikörperfärbung wurden die Deckgläschen in mit Parafilm ausgelegte, feuchte Kammern überführt und für 45 min bei 37°C mit der entsprechenden Blocklösung verdünnten Primärantikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläschen dreimal 5 min bei RT mit Blocklösung gewaschen. Danach wurden die entsprechenden mit dem Fluorophor gekoppelten Sekundärantikörper (1:50 in Blocklösung) in Kombination mit dem DNA interkalierenden Hoechst-Farbstoff (Endkonzentration 1µg/ml) für 45 min bei RT auf die Deckgläschen gegeben. Zur Entfernung überschüssiger Antikörper und Farbstoffe wurden die Gläschen dreimal 5 min mit Blocklösung

gewaschen. Die Deckgläser wurden abschließend mit PBS und Wasser gespült und dann in 10% (w/v) Mowiol-Lösung eingebettet.

Die Auswertung erfolgte an einem Zeiss Mikroskop Axioskop 2 HBO 100 und die Bilder wurden mit dem Programm Adobe Photoshop bearbeitet.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.5.1.1 Transformation von Bakterien durch Hitzeschock

50-100 μ l transformationskompetente Bakterien der Stämme DH5 α oder XL-1 Blue wurden zunächst auf Eis aufgetaut, mit 0,1-1 μ g der zu amplifizierenden DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte eine Hitzeschock bei 42 $^{\circ}$ C für 45 sec und eine weitere Inkubation von 2 min auf Eis. Anschließend wurden den Kulturen 750 μ l SOC oder LB-Medium zugegeben und 45 min unter Schütteln bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert. Zur Austreichung der Zellen auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden die Zellen kurz pelletiert, in 100 μ l LB-Medium resuspendiert. Einzelkolonien konnten 24h gepickt werden und zur Animpfung von Flüssigkulturen eingesetzt werden.

3.5.1.2 Analytische Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

1-1,5 ml einer 5 ml Übernachtskultur transformierter Bakterien wurde 2 min bei 3000 rpm (Eppendorf Minifuge) pelletiert und das Pellet anschließend in 110 μ l STET Puffer (10 mM Tris/ HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1mM EDTA pH 8,0, 0,5mg/ ml Lysozym) resuspendiert. Die Suspension wurde zunächst 5 min bei RT und dann 1 min bei 95 $^{\circ}$ C inkubiert. Anschließend wurden der Überstand durch 15 min Zentrifugation bei 13000 rpm (Eppendorf Minifuge) und 4 $^{\circ}$ C geklärt. Das Pellet wurde entfernt und der Überstand mit 110 μ l Isopropanol gemischt. In einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 13000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, Eppendorf Minifuge) wurde die DNA pelletiert. Die DNA wurde in 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30-50 μ l H₂O dest. resuspendiert.

3.5.1.3 Aufreinigung von DNA durch Phenolextraktion

Hierzu wurden die DNA Proben mit einem Volumenanteil Phenol (TE gesättigt, pH 8,0)/ Chloroform versetzt und 10 min auf einem Überkopfschüttler gemischt bis eine Emulsion entsteht. Danach wurden die Proben 10 min bei 13000 rpm (Eppendorf Minifuge) und RT zentrifugiert und die wässrige Lösung vorsichtig abgenommen. Die abgenommene Lösung wurde nun mit einem Volumenanteil Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1, v/v) gemischt und erneut zentrifugiert (10 min, 13000 rpm, RT, Eppendorf Minifuge). Die obere wässrige Schicht wurde abgenommen und die DNA durch Zugabe von 1/ 10 Volumenanteilen 5M Na-Azetat und 2,5 Volumenanteilen 100% Ethanol und 30 min Lagerung bei -20°C präzipitiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation (15 min, 13000 rpm, RT, Eppendorf Minifuge) pelletiert, einmal mit 70% Ethanol (v/v) gewaschen, getrocknet und in TE Puffer pH 8,0 resuspendiert.

3.5.2 Isolierung von RNA

Die Isolierung von Total-RNA aus kultivierten Zellen wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Diese Methode beruht auf einer Zellyse durch Guanidinium-Isothiocyanat in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol und der selektiven Adsorption von RNA an eine Silica-Gel Membran. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Die Quantität und Qualität der RNA wurde durch Absorptionsmessungen bei den Wellenlängen 260/280 nm im Spektrophotometer und durch Elektrophorese auf einem Formaldehyd-Agarose Gel geprüft. Die in RNase freiem Wasser gelöste RNA wurde in Aliquots bei -80°C gelagert.

3.5.3 Northern Blot

Alle verwendeten Lösungen wurden mit H₂O angesetzt, das für 12h bei 37°C mit 0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt und anschließend autoklaviert wurde. Andere Materialien wurden hitzesterilisiert und die Gelkammer mit Zubehör wurde mit 10% SDS (w/v) gereinigt und mit DEPC-H₂O nachgespült.

3.5.3.1 Elektrophorese von RNA

1,5 g Agarose wurden in 108 ml DEPC-H₂O aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf ca 60°C mit 25 ml einer 37% haltigen Formaldehydlösung und 15 ml 10x

RNA-Laufpuffer versehen. Die flüssige Agarose wurde anschließend auf einen mit SDS behandelten Gelträger gegossen.

20µg Total-RNA wurden in einem Eppendorfgesäß lyophilisiert und danach in 15 µl RNA-Probenpuffer (50% deionisiertes Dimethylformamid, 20% DEPC-H₂O, 10% 10x Laufpuffer, 20% Formaldehyd-Lösung (37%)) aufgenommen. Die Proben wurden 10 min bei 65°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 2 µl Ethidiumbromid (400 µg/ ml in DEPC-H₂O) und 2 µl 10x RNA-Ladepuffer (50% Glycerin, 1 mM EDTA pH 8,0, 0,25% Bromphenolblau) wurden die Proben auf das Gel geladen und bei einer Spannung von 40-50 V für 4-6 h in 1x RNA-Laufpuffer (20 mM MOPS pH7,0, 80 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA) aufgetrennt.

3.5.3.2 Kapillartransfer auf eine Nylonmembran

Nach der Elektrophorese wurde das Gel zweimal in DEPC-H₂O gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen. Bei Fragmentgrößen über 2,5 kb wurde das Gel zusätzlich für 20 min in 50mM NaOH-Lösung inkubiert, bevor es zweimal 20 min in 20x SSC-Lösung (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat pH 7,0) äquilibriert wurde. Der Kapillartransfer erfolgte über Nacht auf eine Zetaprobe GT Nylonmembran (BioRad) in 20x SSC-Puffer. Nach dem Transfer wurde die Membran in 2x SSC-Puffer (300 mM NaCl, 30 mM Na-Citrat) gewaschen und anschließend wurde die RNA auf der feuchten Membran durch UV-Quervernetzung mit 150 mJoule (GS Gene Linker, Biorad; Programm C3) fixiert.

3.5.3.3 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Proben

Über Agarosegel isolierte und gereinigte (Quiagen Gel-Purification-Kit) DNA-Fragmente wurden mittels "Random Prime" Methode unter Verwendung des "Prime-It II Kit" radioaktiv markiert. Hierzu wurden 20 µg der als Sonde dienenden DNA und 20 µCi α-[³²P]-dCTP (Redivue 3000 Ci/ml) pro Reaktion eingesetzt. Das Markierungsverfahren erfolgte nach Herstellerangaben. Die radioaktiv markierten DNA-Sonden wurden durch Gelfiltration über Sephadex G-50 Säulen (ProbeQuant G-50, Pharmacia) von überschüssigem ³²P-dCTP gereinigt. Die Membran wurde zunächst 4-8 Stunden in Prähybridisierungslösung (50% Formamid, 5x Denhardt's, 5x SSC, 50 mM NaHPO₄ pH 6,5, 0,1% SDS, 100 µg/ ml Lachssperma-DNA in DEPC-H₂O) bei 42°C inkubiert.

Nach dieser Inkubationszeit wurde die radioaktiv markierte Probe 5 min bei 95°C denaturiert und zur Hybridisierungslösung (50% Formamid, 1x Denhardt's, 5x SSC, 50 mM NaHPO₄ pH 6,5, 0,1% SDS, 10% Dextransulfat, 100 µg/ ml Lachssperma-DNA in DEPC-H₂O) gegeben und die Prähybridisierungs- durch die Hybridisierungslösung ersetzt. Die Membran wurde in der Hybridisierungslösung 16 h bei 42°C weiter inkubiert. Anschließend wurde die Membran in drei aufeinanderfolgenden Schritten gewaschen:

- 1.) 2xSSC, 0,1% SDS, 30 min bei RT
- 2.) 2xSSC, 1% SDS, 30 min bei RT
- 3.) 1xSSC, 1% SDS, 30 min bei 55°C

Bei zu starkem Hintergrundsignal wurde der letzte Waschschrift bei 65°C wiederholt. Der Nachweis erfolgte über ein Autoradiogramm.

3.5.4 Amplifikation von DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR zum Nachweis der Expression von c-Myc und Miz1 wurde in 50 µl Gesamtvolumen durchgeführt, dabei wurden 2,5 Einheiten der Taq-Polymerase (Sigma), 5 µl des entsprechenden Taq-Polymerase Puffers, 0,2 mM dNTPs (Sigma), 50 pmol des 5'- und 3'- Oligonukleotids sowie 1 µl der im reverse Transkriptaseschritt erhaltenen cDNA oder 200-500 ng genomische DNA im Reaktionsansatz gemischt. Die Ansätze durchliefen in einem Primus Thermocycler (MWG) die unten aufgeführten Temperaturprogramme.

Hotstart bei 95°C

x Zyklen	5 min 95°C (Denaturierung)
	30 sec 95°C (Denaturierung)
	45 sec X°C (Annealing)
	45 sc 72°C (Amplifikation)
	5 min 72°C (Amplifikation)

humane Gene

Gen	Annealing Temp.	Zyklen-Anzahl	Fragmentgröße (bp)
<i>c-MYC</i>	60°C	25	689
<i>MIZ1</i>	55°C	30	496

<i>GAPDH</i>	50°C	25	459
<i>pEYK3.1</i>	58°C	35	1100 (pEYK3.1 leer)

Gene der Ratte

Gen	Annealing Temp.	Zyklen-Anzahl	Fragmentgröße (bp)
<i>Gapdh</i>	50	25	455

3.5.5 *In vitro* Mutagenese

Für diese Technik wurde das QuickChange site directed mutagenesis kit (Stratagene) nach Angaben des Herstellers verwendet. Um die Expression mutierter Miz1 Proteine zu erhalten wurden verschiedene Basen eines Triplets so verändert, daß das entsprechende Triplet für die Aminosäure kodiert, die bei der Translation gegen die ursprüngliche Aminosäure ausgetauscht werden soll.

Dazu wurden synthetische Oligonukleotidpaare benutzt, die die gewünschten Mutationen tragen. Als Matritze dienten 20ng eines CMV-Miz1 Expressionsplasmids. Zur Generierung und Amplifikation einer mutierten Miz1 cDNA in der PCR wurde die PfuTurbo DNA Polymerase verwendet. Das PCR Programm wurde nach Angaben des Herstellers mit 12 Zyklen durchgeführt. Die eingebrachten Mutationen wurden durch Sequenzierung (Seqlab, Göttingen) verifiziert.

3.6. Analyse von Protein/DNA-Komplexen

3.6.1 Oligonukleotid-"Pulldown" von DNA bindenden Proteinen

3.6.1.1 Hybridisierung der biotynilierten Oligonukleotide

Es wurden 100µg (50µg Sense und 50µg anti-Sense) der einzelsträngigen, komplementären und an der 5'Position biotinylierten Oligonukleotide (Firma MWG, München) in 1x Annealing-Puffer (50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,4) auf eine Endkonzentration von 1 µg/ µl verdünnt und anschließend 2 min bei 100°C erhitzt. Zum Hybridisieren ließ man die Oligonukleotide über mehrere Stunden langsam abkuehlen, präzipitierte sie danach in Ethanol und nahm sie in 50 mM TE pH 8,0 auf. Die Konzentration der doppelsträngigen Oligonukleotide wurde auf 1 µg/ µl eingestellt. (Die verwendeten Oligonukleotidsequenzen sind im Materialteil angegeben).

3.6.1.2 Äquilibrierung der Streptavidin–Agarose

Das benötigte Volumen an Streptavidin-Agarose wurde entnommen und in einem ausreichend grossen Volumen Lyse-Puffer H (100 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH pH 7,9, 10% Glycerin, 5 mM MgCl₂, 0,1 % NP-40, 1 mM DTT, Phosphataseinhibitor Mix I und Proteinaseinhibitor Mix 1:1000) dreimal gewaschen. Die Zentrifugationsschritte erfolgten bei 5000 rpm, für 4 min und 4°C in einer Eppendorf-Zentrifuge. Das Volumen Puffer H zu Streptavidin-Agarose wurde 1:1 eingestellt.

3.6.1.3 Herstellung der Gesamt-Proteinlysate

Hierzu wurden pro Oligonukleotidansatz jeweils Zellen einer 90% konfluenten 15cm Kulturschale verwendet, die ueber Abschaben mit einem Plastischaber geerntet wurden. Nach Pelletierung (1000 rpm, 10 min, 4°C, Hereaus Megafuige OR) der Zellen in 15 ml Falcon-Röhrchen wurden diese in 1 ml Lyse-Puffer H (100 mM KCl, 10 mM HEPES-KOH pH 7,9, 10% Glycerin, 5 mM MgCl₂, 0,1 % NP-40, 1 mM DTT, Phosphataseinhibitor Mix I und Proteinaseinhibitor Mix 1:1000) resuspendiert und wie unter 2.4.1.1 beschrieben sonifiziert.

3.6.1.4 Vorreinigung der Proteinlysate

Dem gesamten Volumen (1 ml) des erhaltenen Proteinlysats wurden 50 µl äquilibrierte Streptavidin-Agarose (Naßvolumen) zugegeben und 1 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach diesem Reinigungsschritt wurde die Agarose abzentrifugiert (5000 rpm, 4 min, 4°C, Heräus Minifuge RF), der Überstand abgenommen und ein Aliquot für die Ladekontrolle entnommen.

3.6.1.5 Oligonukleotidpulldown

Je 1 ml des vorgereinigten Proteinlysates wurde mit 1 µg der biotynilierten Oligonukleotide und 10 µg Poly(dI)/ Poly(dC) (Amersham) versetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden 30 µl der äquilibrierten Streptavidin-Agarose (Naßvolumen) zugegeben und 1 h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler rotieren lassen. Die Agarose wurde abzentrifugiert (5000 rpm, 4 min, 4°C, Heräus Minifuge RF.) und dreimal mit 1 ml Lyse-Puffer H für 10 min gewaschen. Das gewaschene Agarosepellet wurde in 80 µl 2x Lämmli-Puffer resuspendiert, 5 min bei 95°C gekocht und im Western-Blot Verfahren analysiert.

4. Ergebnisse

4.1 Retroviraler „Screen“ einer cDNA-Expressionsbibliothek zur Identifizierung neuer Inhibitoren des Miz1 vermittelten Wachstumsarrestes

4.1.1 Phänotypische Identifizierung von Inhibitoren der wachstumshemmenden Funktion von Miz1

Studien haben gezeigt, daß der Transkriptionsfaktor Miz1 einen Wachstumsarrest in Zellen induzieren kann zum Beispiel durch die Erhöhung der Expression der Zyklin abhängigen Kinase Inhibitoren p21^{Cip1} und p15^{Ink4b} (Staller *et al.*, 2001). Diese Transaktivierungsaktivität von Miz1 wird durch die Interaktion mit Myc gehemmt. Zur Identifizierung weiterer Inhibitoren, die wie Myc die wachstumshemmenden Fähigkeiten von Miz1 hemmen können wurde ein genetisches Screen-Verfahren angewandt. Es wurde dabei nach neuen Faktoren gesucht, die einen durch Überexpression von Miz1 induzierten Wachstumsarrest überkommen können.

Zunächst wurden Miz1-exprimierende Retroviren in virusproduzierenden Phoenix Zellen hergestellt. Da die Anzahl der infektiösen Partikel im Überstand nicht bekannt war, wurde der Virustiter des Virusüberstandes durch Verdünnungsreihen getestet. Ziel war es eine Viruskonzentration einzusetzen, die nach Infektion das Wachstum der Zellen vollständig hemmt, um im späteren Screen-Verfahren die Entstehung von falsch positiven Zellklonen zu verhindern. Falsch positive Zellklone sind in diesem Fall Zellen, die durch eine geringere Miz1 Expression und nicht durch Expression eines die Miz1 Funktion hemmenden Faktors entstehen.

Zunächst wurde ein Kolonie-Wachstums-Experiment in Rat1-Fibroblastenzellen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit c-Myc exprimierenden Retroviren infiziert und 48 Stunden später mit Puromycin-haltigem Medium selektioniert. Nach erfolgter Selektion wurden die c-Myc exprimierenden Zellen mit Miz1 exprimierenden Retroviren superinfiziert. Als Kontrolle wurden Zellen jeweils nur mit dem Resistenzgen gegen Puromycin oder Hygromycin exprimierenden Retroviren infiziert. Wie die mit Giemsa gefärbten Zellkulturschalen (siehe Abbildung 4) zeigen, wird das Wachstum der Fibroblastenzellen vollständig durch die retrovirale Infektion erzeugte Expression von Miz1 gehemmt, so daß wenig Hintergrundkolonien im folgenden

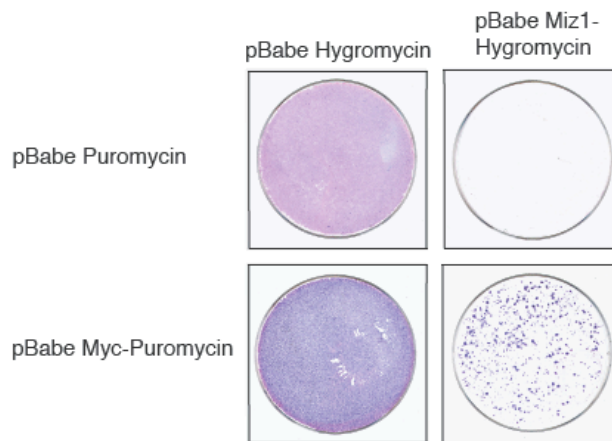


Abbildung 4: Myc hemmt den Miz1 induzierten Wachstumsarrest von Rat1-Fibroblastenzellen
 Rat1-Fibroblasten wurden mit rekombinanten Myc-Puromycin exprimierenden Retroviren und zur Kontrolle mit pBabe Puromycin infiziert und 48h später mit Puromycin selektiert 48 h nach Erstinfektion wurden die Zellen mit rekombinanten Miz1-Hygromycin oder pBabe Hygromycin exprimierenden Retroviren superinfiziert. Die Selektion Hygromycin erfolgte nach weiteren 48h. 7 Tage nach Selektion wurden die Zellen mit Giemsa-Lösung angefärbt.

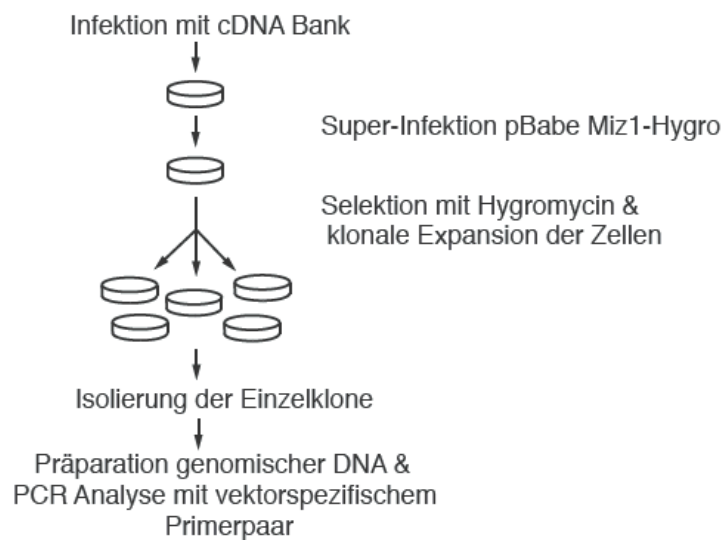


Abbildung 5: Schema des retroviralen Screens zur Identifizierung von Inhibitoren der wachstumshemmenden Wirkung von Miz1

Dargestellt ist das Infektions- und Selektionsschema des retroviralen Screens. Rat1-Fibroblasten wurden mit einer größenfraktionierten cDNA-Expressionsbank (K562-Erythrozytenleukemie Zelllinie, Fraktionen 1-3kb, 3-5kb und 5> kb) infiziert und 48h später mit rekombinanten Miz1-Hygromycin exprimierenden Retroviren superinfiziert. Die Selektion erfolgte nach weiteren 48h mit Hygromycin. Die überlebenden Zellen wurden klonal expandiert und analysiert.

Screen-Verfahren auftreten sollten. Durch die gleichzeitige Expression von Myc kann der Miz1- induzierte Wachstumsarrest jedoch aufgehoben werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Grundvoraussetzungen für das retrovirale Screen-Verfahren geschaffen waren.

Der Ablauf des retroviralen Screen ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Rat1-Fibroblastenzellen wurden mit einer größenfraktionierten retroviralen cDNA-Expressionsbibliothek infiziert und nach 48 Stunden mit rekombinanten Miz1 exprimierenden Retroviren superinfiziert. Die Selektion mit Hygromycin erfolgte nach weiteren 48 Stunden. Als Selektionskontrollen wurden nicht infizierte und mit dem Resistenzgen gegen Hygromycin infizierte Rat1 Fibroblastenzellen eingesetzt.

Nach erfolgter Selektion mit Hygromycin wuchsen auf den Zellkulturplatten Zellklone heran. Diese Klone hatten nach ca. 3 Wochen eine entsprechende Größe erreicht, um sie zunächst zu vereinzeln und danach zu expandieren (Tabelle 3).

Größenfraktion der cDNA	Anzahl der Klone	Bezeichnung der Klone
1-3 kb	4	K1, K3, K6, K7
3-5 kb	2	K8, K9
> 5kb	3	K2, K4, K5

Tabelle 3: Zusammenfassung der aus dem retroviralen „Screen“ resultierten Zellklone

Auflistung der erhaltenen Zellklone aus den einzelnen Größenfraktionen der cDNA Expressionsbank mit den verwendeten Klon-Bezeichnungen.

Einige dieser Klone wiesen morphologische Veränderungen im Vergleich zu den parentalen Rat1-Fibroblastenzellen auf (Abbildung 6). Die Zellen wirken kleiner und von spindelförmiger Gestalt.

4.1.2 Funktionale Analyse der cDNA-Insertionen aus den erhaltenen Zellklonen

Zur Überprüfung, ob die aus dem Screen hervorgegangenen Zellklone tatsächlich funktionale cDNAs enthalten, die zu einer Hemmung des Miz1-induzierten Wachstumsarrestes führen, wurde ein sekundärer Screen mit Hilfe von Replikations-kompetenten Mouse Moloney Viren (MoMuLV) durchgeführt. Diese

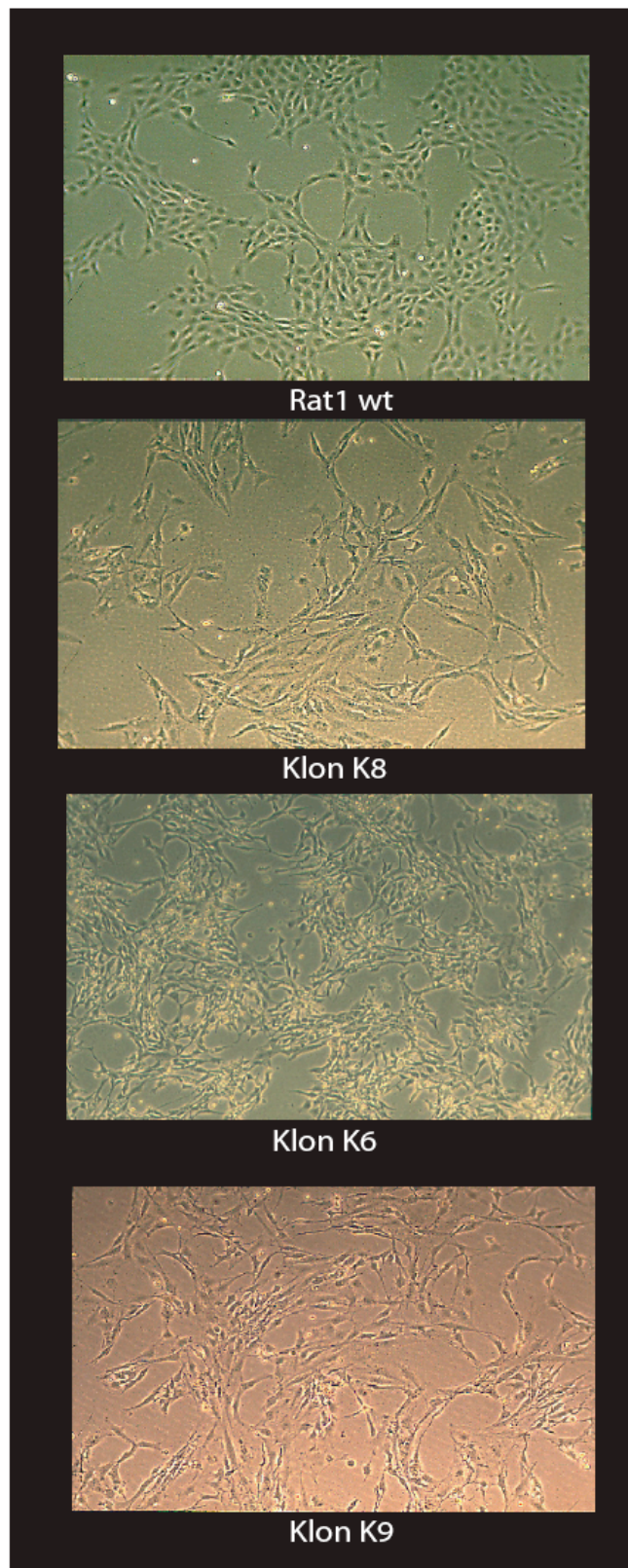


Abbildung 6: Morphologie der Zellklone aus dem retroviralen Screen
Dargestellt sind Fotografien der exemplarisch ausgewählten Rat1 Klone K6, K8 und K9 im Vergleich zu parentalen Rat1 Fibroblasten (Rat1 wt).

Viren erkennen die in das Zellgenom integrierten retroviralen cDNAs anhand einer sogenannten PSI-Sequenz, die zwischen dem „Long terminal repeat (LTR)“ und der cDNA Integrationsstelle liegt. Bei der Neubildung von Viren in der Wirtszelle werden dadurch nicht nur die in RNA umgeschriebenen viralen Gene mit in die Virushülle verpackt, sondern diese können durch DNA-Sequenzen der Wirtszelle ersetzt werden. Die maximale Größe der Fremd-DNA beträgt dabei etwa 8-9kbp (Mann *et al.*, 1983).

In Abbildung 7 ist das Prinzip des Mouse Moloney Virus abhängigen cDNA-Transfers schematisch dargestellt. Wenn die Zellklone einen Inhibitor der wachstumshemmenden Funktion von Miz1 exprimieren, sollte die entsprechende retroviral infizierte cDNA mit Hilfe der Mouse Moloney Viren mobilisiert werden können. Durch die Infektion von Rat1 Fibroblastenzellen (Rezipientenzellen) mit diesen Mouse Moloney Viren sollte nach Superinfektion mit Miz1 exprimierenden Retroviren der Miz1 induzierte Wachstumsstopp erneut inhibierbar sein.

Die Rat1 Zellklone K1 bis K9 aus dem primären retroviralen „Screen“ wurden zum einen mit pBabe Miz1/Hygromycin und zum anderen mit cDNA Sequenzen einer Expressionbibliothek infiziert. Bei der Infektion dieser Zellklone mit Mouse Moloney Viren können drei unterschiedliche Kombinationen dieser retroviral übertragenen Gene auf die Rezipientenzellen übertragen werden. Zum einen kann das Gen für Miz1 zusammen mit dem Resistenzgen gegen Hygromycin mobilisiert werden (Miz1/Hygromycin). Zum anderen kann eine cDNA Sequenz aus der Expressionsbibliothek übertragen werden (cDNA). Und als letzte Möglichkeit könne alle drei Sequenzen (Miz1/ Hygromycin + cDNA) in die Rezipientenzelle transferiert werden.

Das Überleben der Zellen und die Ausbildung von Zellklonen im folgenden Infektions- und Selektionsschema hängt davon ab, welche Gene übertragen werden (siehe Abbildung 8). Wird nur das *MIZ1*-Gen zusammen mit dem Resistenzgen gegen Hygromycin übertragen, überleben die Zellen die Hygromycinbehandlung, aber nicht die hohe Expression von Miz1, weil diese einen Wachstumsarrest in den Zellen induziert. Wird das *MIZ1*-Gen zusammen mit dem Resistenzgen gegen Hygromycin und einer cDNA aus der Expressionsbibliothek übertragen, können nach Hygromycinselektion Zellklone wachsen, falls die cDNA für einen Inhibitor der wachstumshemmenden Funktion von Miz1 kodiert.

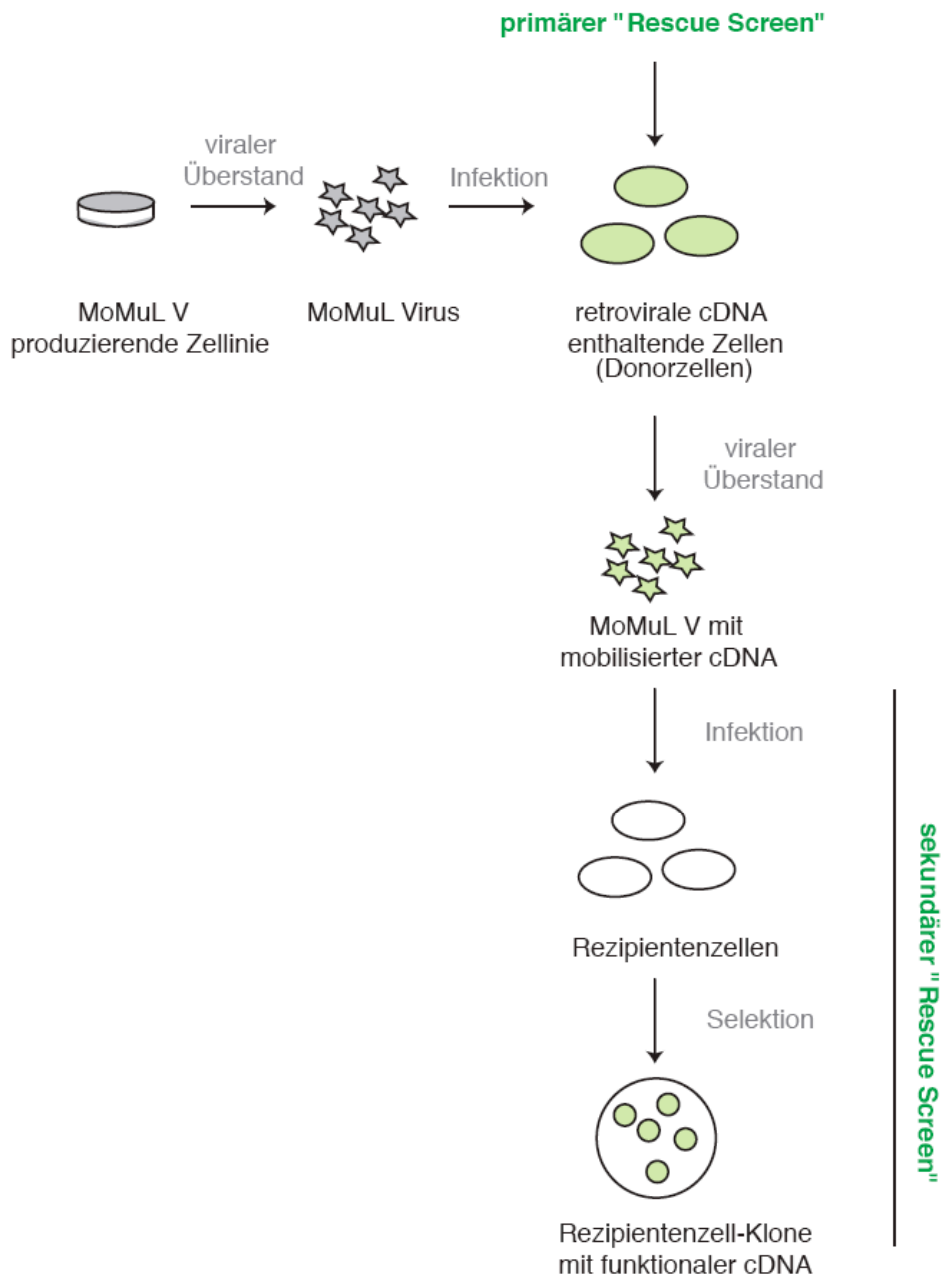


Abbildung 7: Schema des sekundären „Screens“ zur funktionalen Analyse der erhaltenen Zellklone

Dargestellt ist das Infektions- und Selektionsschema des sekundären „Screens“. Die aus dem primären „Screen“ erhaltenen Zellklone (Donorzellen) wurden zur Mobilisierung der rekombinanten cDNAs mit Mouse Moloney Viren infiziert. Nach 72h wurde der virale Überstand abgenommen und damit die Rezipientenzellen infiziert. Nach 48h erfolgte die Selektion auf die transferierten cDNA Sequenzen. Die nach der Selektion wachsenden Zellklone wurden klonal expandiert und genomische DNA zur Identifikation der cDNA-Insertionen präpariert.

Für den sekundären Screen wurden die aus dem primären Screen stammenden Zellklone K1-K9 mit Mouse Moloney Viren infiziert. Anschließend wurde der Mouse Moloney Viren enthaltende Überstand von diesen Zellen abgenommen und zur Infektion von parentalen Rat1 Fibroblastenzellen eingesetzt. Die Infektionen wurden in Dublikaten durchgeführt. Ein Teil der Zellen wurde 48 Stunden später mit Miz1 und dem Resistenzgen gegen Hygromycin exprimierenden Retroviren infiziert. Nach weiteren 48 Stunden wurden die infizierten Zellen mit Hygromycin selektioniert. Die eingesetzte Konzentration des Miz1 exprimierenden retroviralen Überstandes induzierte einen Wachstumsarrest in den parentalen Rat1 Fibroblastenzellen. Der andere Teil der mit Mouse Moloney Viren infizierten Rat1 Fibroblastenzellen wurde 48 Stunden nach retroviraler Infektion nur einer Selektion mit Hygromycin unterzogen. Als Kontrollen dienten parentale Rat1 Fibroblasten die mit Mouse Moloney Viren infiziert wurden, die das Resistenzgen gegen Puromycin exprimieren. Sieben Tage nach erfolgter Selektion wurden die Zellen fixiert und mit Giemsa gefärbt. Die auf den Platten angefärbten Zellkolonien (siehe Abbildung 9) wurden zur Auswertung gezählt. Die erhaltenen Koloniezahlen der korrespondierenden Dublikate sind in der Tabelle 4 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, daß nach erfolgter Hygromycins Selektion von den Zellkulturen, die mit Miz1 exprimierenden Retroviren superinfiziert wurden, nahezu die gleiche Anzahl von Klonen hervorging, wie von den Zellkulturen ohne zusätzliche Superinfektion mit Miz1 exprimierenden Retroviren. Dieses läßt den Schluß zu, daß die in den Klonen K1 bis K9 inserierten cDNA Sequenzen der Expressionsbibliothek durch die Mouse Moloney Viren mit hoher Effizienz übertragen wurden, und daß diese cDNA Sequenzen für Inhibitoren der wachstumshemmenden Funktion von Miz1 kodieren. Die Anzahl der Zellklone nach alleiniger Selektion mit Hygromycin, ohne zusätzliche Superinfektion mit Miz1, kann auf den Zugewinn einer inhibitorischen cDNA, aber auch auf eine niedrige Miz1 Expression zurückgeführt werden. Das Absterben der Kontrollzellen in beiden Ansätzen beweist, daß der sekundäre Screen keine falsch positiven Kolonien hervorbrachte.

Die Schwankungen der überlebenden Kolonien zwischen den einzelnen Klonen (M1-M9) könnte zum einen an unterschiedlich guten Infektionseffizienzen durch den MoMuLV liegen, aber auch an qualitativen Unterschieden im Bezug auf die inhibitorischen Fähigkeiten der cDNA Sequenzen.

Zelltyp	mobilisierte cDNA	Hygromycin-Selektion	Miz1-Hygromycin Superinfektion und Hygromycin Selektion
Rat1 (Ktr.)	keine	0	0
Rat1-Puro (Ktr.)	Puromycin	0	0
M1	K1	1500	1500
M2	K2	28	22
M3	K3	120	111
M4	K4	45	55
M5	K5	500	450
M6	K6	700	700
M7	K7	500	500
M8	K8	325	180
M9	K9	12	10

Tabelle 4: Quantitative Auswertung der aus dem MoMuLV sekundär „Screen“ erhaltenen Zellkolonien.

Es wurden die Zellkolonien auf den nach 7 Tagen nach Hygromycin Selektion Giemsa gefärbten Zellkulturschalen gezählt und aufgelistet. Als Kontrollen dienten parentale Rat1 Fibroblasten (Rat1 Ktr.) und Rat1 Fibroblasten die mit MoMuLV infiziert wurden, die ein Resistenzgen gegen Puromycin exprimieren (Rat1-Puro Ktr.). M1-M9 bezeichnet die aus dem sekundären Screen erhaltenen Rat1-Fibroblastenklone. Die mittels MoMuLV mobilisierten cDNA Insertionen, der aus dem primären Screen stammenden Klone sind mit K1-K9 bezeichnet.

4.1.3 Genotypische Analyse der potentiellen Inhibitoren des Miz1 induzierten Wachstumsarrestes

Um im Weiteren die cDNA Sequenzen zu identifizieren und zu analysieren, die die Miz1-Funktion hemmen, wurde aus den Rat1 Klonen K1 bis K9 zum einen genomische DNA und zum anderen RNA isoliert. Die RNA wurde mittels reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die genomische DNA und die cDNA wurden für PCR Analysen mit pEYK3.1 vektorspezifischen Primern und mit einem c-Myc spezifischen Primerpaar eingesetzt.

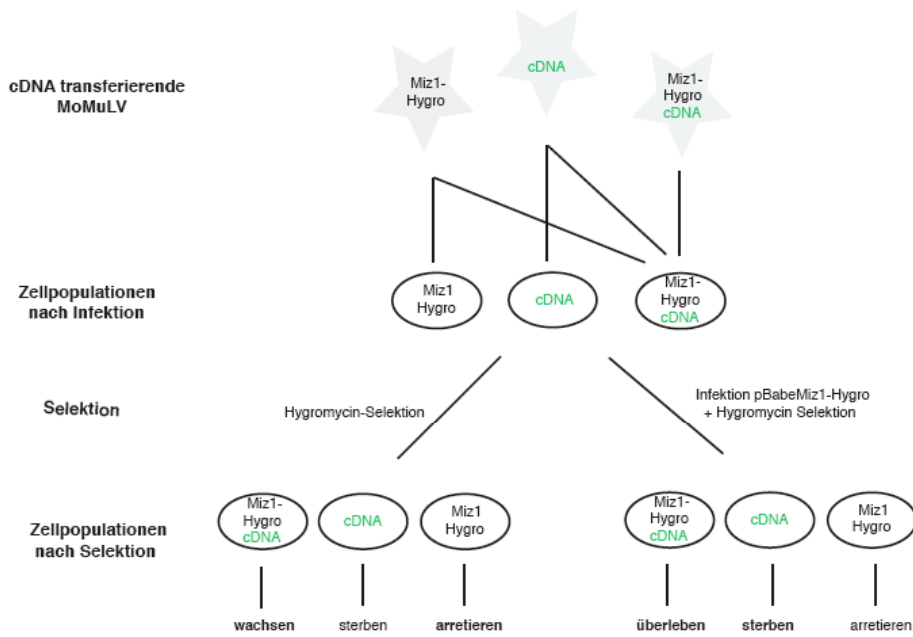


Abbildung 8: Erwartete Zellpopulationen im sekundären Screen-Verfahren

Die MoMuLV übertragen entweder die cDNAs für Miz1 und das Resistenzgen gegen Hygromycin oder eine cDNA der Expressionsbibliothek oder alle drei cDNAs: für Miz1, das Resistenzgen gegen Hygromycin und eine cDNA der Expressionsbibliothek auf parentale Rat1 Fibroblastenzellen. Von diesen Zelltypen wachsen nach Hygromycinselektion nur die Zellpopulationen, die eine cDNA der Expressionsbibliothek in Kombination mit den cDNAs für Miz1 und das Resistenzgen gegen Hygromycin exprimieren. Die Zellpopulationen die nur die cDNAs für Miz1 und das Resistenzgen gegen Hygromycin exprimieren arretieren aufgrund der Expression von Miz1 in der G1-Phase. Die Zellen, die allein eine cDNA der Expressionsbibliothek exprimieren unterliegen der Hygromycinselektion.

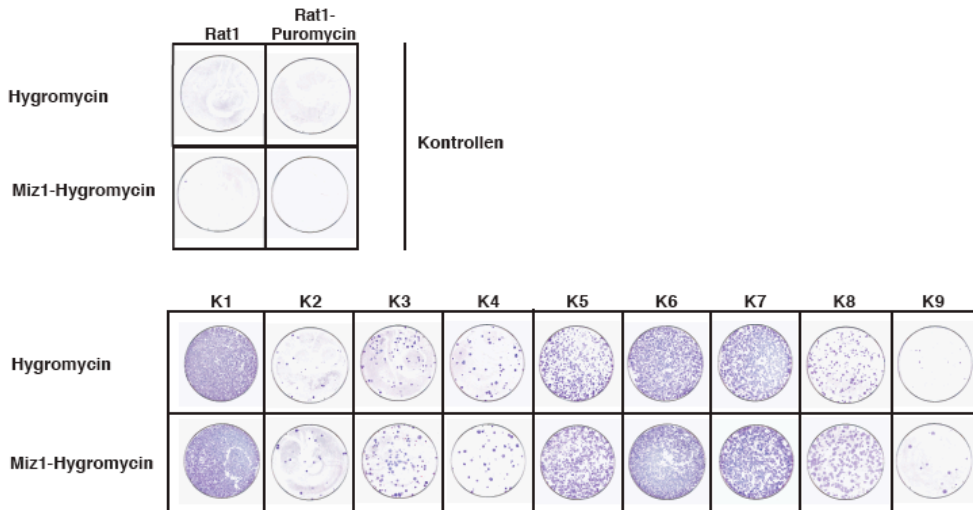


Abbildung 9: Darstellung der Ergebnisse des sekundären „Screens“

Dargestellt sind die Giemsa-Lösung angefärbten Kulturschalen der Klone M1-M9. Zunächst wurden parentale Rat1 Fibroblasten (Rezipientenzellen) mit MoMuLV Viren, die mobilisierte Gene der Klone K1-K9 enthalten, infiziert. 48h nach Infektion mit MoMuLV Viren, wurden die Zellen entweder mit pBabe Hygromycin oder pBabe Miz1-Hygromycin superinfiziert. 48h nach Superinfektion wurden die Zellen mit Hygromycin selektioniert und nach weiteren 7 Tagen wurden die Zellen fixiert und mit Giemsa Lösung gefärbt. Als Kontrollen dienten parentale Rat1 Fibroblasten die nicht oder mit MoMuLV Viren infiziert wurden, die ein Resistenzgen gegen Puromycin exprimieren.

Aufgrund von morphologischen Ähnlichkeiten und vergleichbarem Wachstumsverhalten einiger Klone mit c-Myc und Miz1 koinfizierten Rat1 Fibroblastenzellen (Daten nicht gezeigt) wurde zunächst mittels Standard- und RT-PCR Analysen der genomischen DNA sowie der cDNA überprüft, ob die Klone eine für humanes c-Myc kodierende cDNA Sequenz tragen. Die hierzu eingesetzten Primer sind spezifisch für das humane *c-MYC*-Gen und amplifizieren ein ungefähr 500 Basenpaar umfassendes Produkt. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Analysen der cDNA (siehe Abbildung 10a) sowie der genomischen DNA (siehe Abbildung 10b) zeigen beide eine deutliche Expression der exogenen humanen *c-MYC* Allele in den Klonen K1 bis K7. Die Klone K8 und K9 weisen dagegen keine Expression von humanem c-Myc auf. Die Spezifität der Primer für das humane *c-MYC*- Gen wird durch das negative Resultat der Rat1 Fibroblasten cDNA Probe (siehe Abbildung 10a) bestätigt. Als positive Kontrolle diente cDNA aus den humanen Zelllinien HeLa und HaCat (siehe Abbildung 10a), die relativ hohe Menge von endogenem c-Myc exprimieren. Die exogene c-Myc Expression der Klone K1 bis K6 ist identisch oder höher als die endogene der beiden humanen Zelllinien.

Um die cDNA Insertionen der beiden Rat1 Klone K8 und K9, die sich nicht als humane c-Myc Sequenzen herausstellten, zu identifizieren, wurde eine PCR Analyse der genomischen DNA aus diesen beiden Klonen mit einem für den pEYK 3.1 vektorspezifischen Primerpaar durchgeführt. Das dabei amplifizierte PCR Produkt wurde zu Sequenzierungsanalysen eingesetzt. Die PCR mit dem vektorspezifischen Primern wurde mit genomischer DNA der Klone K1, K3, K8 und K9 ausgeführt. Die genomische DNA der Klone K1 und K3 diente zur Verifizierung und gleichzeitigen Primerkontrolle. Wie die elektrophoretische Analyse der PCR Produkte in Abbildung 11 zeigt, weisen die Klone K1 und K3 ein 1,6 kb großes Produkt auf. Dieses entspricht der für die c-Myc kodierende Sequenz erwartete Länge. Die amplifizierten PCR Produkte der Klone K8 und K9 betragen beide ungefähr 0,8 kb.

Die erhaltenen PCR-Produkte aller vier Klone wurden auf einem präparativen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, isoliert und aufgereinigt. Die gereinigte cDNA der Klone K1 und K3 wurde zu einer PCR Analyse mit den bereits oben beschriebenen humanen c-Myc Primern benutzt. Die Amplifikation ergab im Vergleich zu den eingesetzten Kontrollen ein spezifisches Produkt mit einer

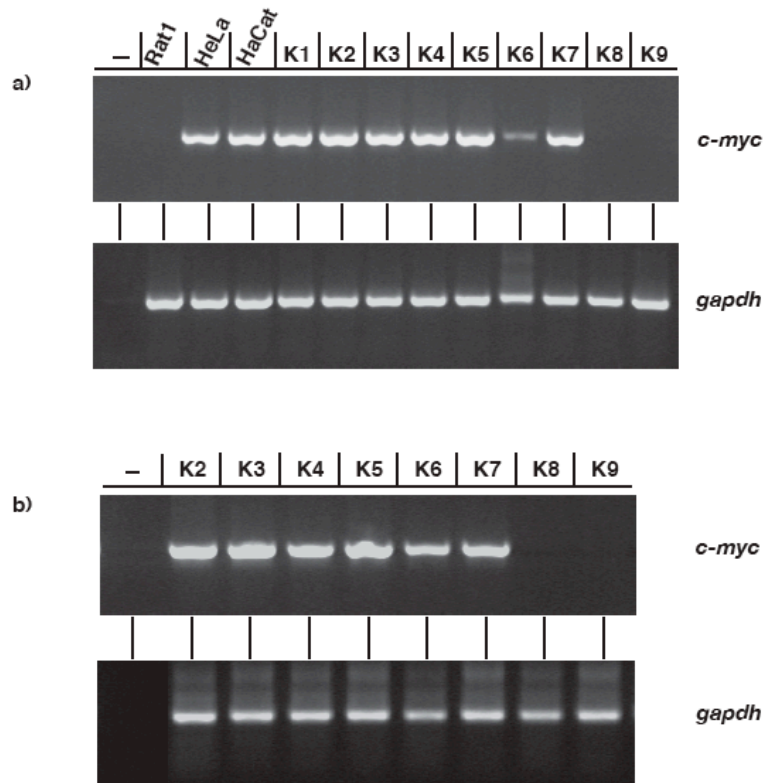


Abbildung 10: Expressionsanalyse der humanen cMyc cDNA-Insertionen in den Rat1 Fibroblasten Klonen K1 bis K9

- a) PCR Analyse der aus den Rat1 Klonen K1-K9 stammenden cDNA mit humanen cMyc spezifischen Primern. Das amplifizierte Produkt beträgt 500 bp. Als Kontrolle diente eine Leerprobe ohne cDNA(-), cDNA aus Rat1 Fibroblasten (Rat1) und cDNA aus den humanen Zelllinien HeLa und HaCat. Eine PCR mit spezifischen Primern für das *gapdh* Gen diente als Ladekontrolle.
- b) PCR Analyse der genomischen DNA aus den Rat1 Klonen K1-K9 mit humanen cMyc spezifischen Primern. Eine Leerprobe ohne cDNA(-) diente als Primerkontrolle. Die Analyse des *gapdh* Gens mit spezifischen Primern wurde als Ladekontrolle benutzt.

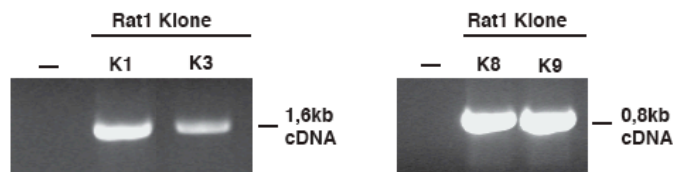


Abbildung 11: Isolierung der retroviralen cDNA Insertionen aus den Rat1 Klonen K1, K3, K8 und K9

Standard PCR –Analyse der genomischen DNA der Rat1 Klone K1, K3, K8 und K9 zur Isolierung der retroviralen Expressionsbank cDNA Insertionen. Die PCR wurde mit für den pEYK3.1 Vektor spezifischen Primern durchgeführt und die Produkte auf einem 1% Agarosegel analysiert. Als Primerkontrolle diente eine Probe ohne genomische DNA (-; Lee kontrolle).

erwarteten Größe von ca. 0,7 kb. Dieses Resultat bestätigte nochmals die Identität der retroviralen cDNA Insertion als c-Myc (siehe Abbildung 12). Die Identität der cDNA Insertionen der Klone K8 und K9 wurde durch Sequenzierung der amplifizierten und gereinigten 0,8 kb großen PCR-Fragmente ermittelt. Ein Vergleich der Sequenzierungsdaten mit einer Gendatenbank ergab, daß es sich bei beiden cDNAs um ein in 3'-5' Richtung in den Vektor integriertes Fragment des humanen gamma *ACTIN*-Gens (*ACTG1*) handelt. Die cDNA Sequenzen waren 600 Basenpaare lang und zeigten eine hundertprozentige Homologie zu der kodierenden Sequenz des humanen *gamma ACTIN*-Gens (NM 001614) von Position 439 bis 1032 (siehe Abbildung 13). Die kodierende Sequenz (cds) des gamma *ACTIN*-Gens beträgt 1228 Nukleotide. Da es sich bei diesen cDNA Insertionen nur um verkürzte und in 3'-5' Richtung in den retroviralen Vektor integrierte Sequenzen des *gamma ACTIN*-Gens handelte, wurden keine weiteren Analysen durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob die Klone K1 bis K9 nicht nur c-Myc und gamma Actin ektopisch exprimieren, sondern vielleicht auch eine N-Myc Expression aufweisen, wurde ein Northern Blot Experiment mit einer N-Myc spezifischen Sonde der Größe 0,98 kb durchgeführt. Die Neuroblastomzelllinie IMR32, die eine hohe endogene N-Myc Expression besitzt, diente als positive Kontrolle. Als negative Kontrolle dienten HeLa Zellen, die c-Myc aber kein N-Myc exprimieren. Das Autoradiogramm zeigt (siehe Abbildung 14), daß in allen Rat1 Klonen keine N-Myc Expression nachzuweisen ist. Somit scheint die ektopische Expression von c-Myc in den Klonen K1 bis K7 und die ektopische Expression des gamma Actin Fragmentes in den Klonen K8 und K9 für die Überwindung des Miz1-induzierten Wachstumsarrestes verantwortlich zu sein.

4.1.4 Überprüfung der Klone auf Miz1 Expression

Ein wichtiger Aspekt für die Validierung des genetischen Screen-Experiments war es zu kontrollieren, daß die Klone K1 bis K9 auch eine Expression von humanem Miz1 aufweisen. Ein Fehlen der Expression von humanem Miz1 in den Zellklonen, würde allein den Wachstumsarrest aufheben und keine cDNA benötigen, die für einen Inhibitor der hemmenden Funktion von Miz1 kodiert. Es wurde beobachtet, daß Zellen die Expression von Miz1 verringern oder vollständig ausschalten können.

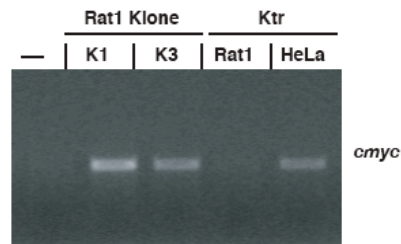


Abbildung 12: Identifizierung der prä-amplifizierten retroviralen cDNA Insertionen der Klone K1 und K3 als humane cMyc Sequenzen

PCR Analyse, der mit Hilfe von pEYK3.1 Vektor-spezifischen Primern prä-amplifizierten retroviralen cDNAs der Klone K1 und K3 (s.Abb. 11), mit humanen cmyc spezifischen Primern. Eine Probe ohne DNA diente als negative Primerkontrolle (-; Leerkontrolle) und cDNA aus Rat1 und HeLa Zellen diente als cmyc Expressionskontrollen (Ktr).

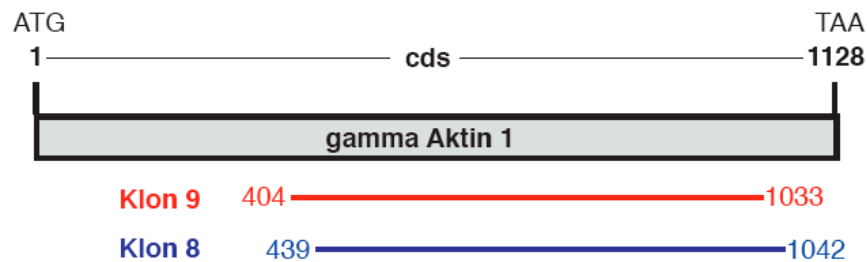


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Abgleiches der sequenzierten cDNA Sequenzen der Klone K8 und K9 mit dem *gamma AKTIN 1* Gen

Die kodierende Sequenz (cds) des humanen *gamma AKTIN* Gens beträgt 1228 Nukleotide. Das Basentriplett ATG markiert den Transkriptionsstartpunkt und das Basentriplett TAA markiert den Transkriptionsempunkt. Die sequenzierte cDNA der Expressionsbibliothek aus dem Klon8 (blau) repräsentiert die Sequenz vom Nukleotid 439 bis 1042 und die cDNA aus dem Klon9 (rot) die Sequenz vom Nukleotid 404 bis 1033 des *gamma AKTIN* Gens. Die Länge der beiden cDNAs aus den Klonen K8 und K9 beträgt ca. 600 Nukleotide.

Dieses erfolgt mechanistisch über Methylierung des Miz1 Promotors (Ikegaki *et al.*, 2007).

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden Proteinlysate der Klone K1 bis K9 im Western Blot Verfahren (Abbildung 15) und mittels Immunopräzipitation (Daten nicht gezeigt) mit einem spezifisch gegen Miz1 gerichteten Antikörpern analysiert. Die dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, daß in allen Klonen eine Miz1 Überexpression vorhanden ist. Die Anwesenheit der exogenen Miz1 Allele konnte für die Klone K8 und K9 auch auf RNA Ebene mittels Northern Blot Analyse bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Daraus läßt sich folgern, daß die Inhibition des Miz1-abhängigen Wachstumsarrestes in den aus dem Screenverfahren erhaltenen Klonen tatsächlich auf den Erwerb einer retroviralen cDNA zurückzuführen ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, daß das experimentelle Grundprinzip des in dieser Arbeit angewandten Screen-Verfahrens funktioniert hat, aber in diesem Fall zu keiner Identifizierung neuer Miz1 Interaktionspartner geführt hat. Die Interaktion zwischen Miz1 und Myc ist seit längerem bekannt (Peukert *et al.*, 1997).

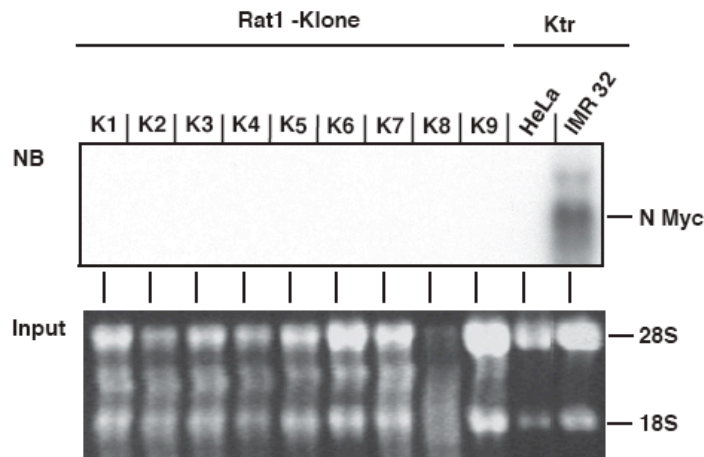


Abbildung 14: Die Rat1 Klone K1 bis K9 weisen keine N-Myc RNA-Transkripte auf

Gezeigt ist das Autoradiogramm eines Northern Blot Experiments, durchgeführt mit isolierter RNA der Rat1 Klone K1 bis K9. Als positiv Kontrolle diente RNA aus IMR 32 Zellen. Detektiert wurde mit einer 0,98 kb großen N-Myc cDNA umfassenden, ^{32}S markierten Sonde.

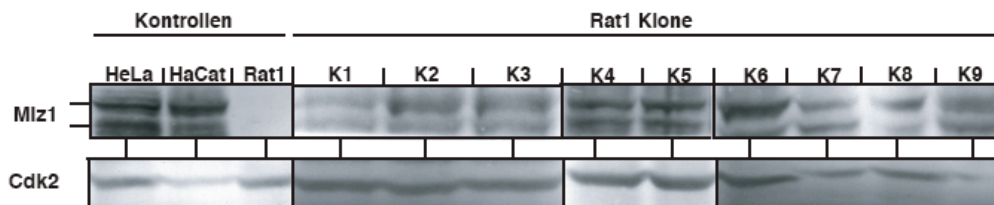


Abbildung 15: Die Rat1 Klone K1 bis K9 zeigen eine deutliche Miz1 Expression

Western Blot Analyse der Proteinlysate der Rat1 Klone K1 bis K9. Die Detektion der exogenen Miz1 Allele erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper spezifisch für Miz1. Als Ladekontrolle diente die Cdk2 Expression. Als positiv Kontrolle für die endogene Miz1 Expression wurden HeLa und HaCat Zellen benutzt und Rat1 Fibroblasten als negativ Kontrolle.

4.2. Funktionale Analyse von 14-3-3eta als negativer Regulator der wachstumsinhibierenden Funktion des Transkriptionsfaktors Miz1

4.2.1 Isolation von 14-3-3eta als Inhibitor der Miz1 Funktion

14-3-3eta wurde in einem retroviralen Screen-Verfahren zur Identifizierung von neuen Miz1 interagierenden Proteinen, welche die wachstumsinhibierende Funktion von Miz1 hemmen, isoliert. Es handelte sich dabei um ein Screen-Verfahren, daß dem unter 4.1 beschriebenen vom Prinzip ähnlich war, aber mit weniger stringenten Bedingungen. Die beiden unterschiedlichen Ansätze sollten helfen, die Bedingungen für solche Screen-Verfahren festzulegen. Ziel war es Selektionsbedingungen zu schaffen, die einerseits die Anzahl der falsch-positiven cDNAs möglichst gering halten und andererseits keine echt-positiven cDNAs durch zu hohe Stringenz verlieren.

Für den zweiten Screen wurde zunächst ein langsam wachsender, Miz1 exprimierender Zellklon generiert. Dafür wurden Rat1 Fibroblasten Zellen mit Miz1 Expressionsvektoren (pBabe Miz1/ Hygromycin) retroviral infiziert und klonal expandiert. Ein im Vergleich zu parentalen Rat1 Fibroblasten langsam proliferierender und exogenes Miz1 exprimierender Klon wurde ausgewählt und mit einer retroviralen cDNA Expressionsbibliothek infiziert. Anschließend wurden diese Zellen durch langsame Serumreduktion von 10% auf 2% und durch immer höheres Verdünnen beim Expandieren selektioniert, bis sich ein deutlicher Wachstumsvorteil der cDNA exprimierenden Zellen gegenüber den Kontrollzellen abzeichnete. Die überlebenden Klone wurden auf funktionale cDNA Sequenzen untersucht. Eine der dabei isolierten cDNA Sequenzen codierte für den kompletten offenen Leserahmen von 14-3-3eta (Accession Nr. S80794).

4.2.2 14-3-3eta hemmt den Miz1 induzierten Wachstumsarrest in der G1-Phase

Um zu überprüfen, ob 14-3-3eta tatsächlich das langsame Wachstum des Miz1 überexprimierenden Zellklons (siehe Abbildung 17a+b; Daten von M. Wanzel) aufheben kann, wurde dieser Klon mit 14-3-3eta exprimierenden Retroviren infiziert und nach dem oben beschriebenen Selektionsschema selektioniert. In Abbildung 17a sind die nach abgeschlossener Selektion mit Giemsa-Lösung gefärbten

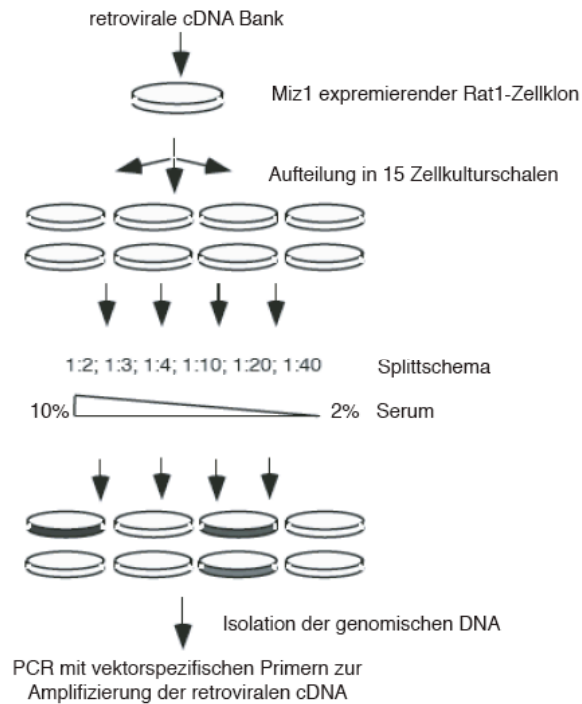


Abbildung 16: Retrovirales Screen- Verfahren zur Identifizierung von Inhibitoren der Funktion von Miz1

Isolationsschema für retrovirale cDNA Sequenzen, die den Miz1 induzierten Wachstumsarrest von Rat1 Fibroblasten hemmen. Die Eigenschaften des langsam wachsenden Miz1 Klon sind in Abbildung 16 dargestellt (von M. Wanzel).

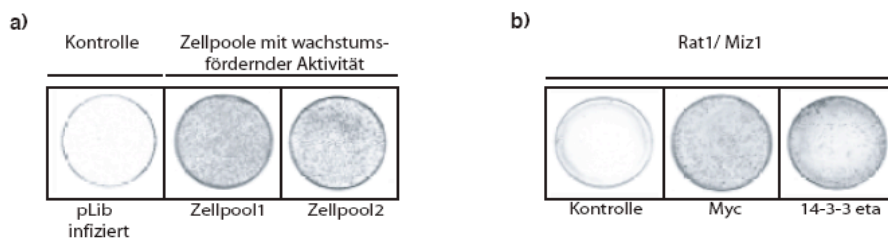


Abbildung 17: Identifizierung der Isoform 14-3-3eta als Inhibitor der Funktion von Miz1

- a) Gezeigt sind Bilder der Giemsa angefärbten individuellen Zellpools, die nach dem letzten Splittingschritt des Screen- Verfahrens (s. Abb.16) erhalten wurden. Die cDNA in Pool1 wurde als 14-3-3eta identifiziert. Der Vektor pLib wurde in diesem Screen als Leervektorkontrolle verwendet.
- b) Hemmung der wachstumshemmenden Fähigkeiten von Miz1 durch 14-3-3eta exprimierende Viren. Der Miz1 exprimierende, langsam wachsende Rat1 Fibroblasten Klon (s. Screen) wurde infiziert mit pbabe-Puro/Myc, pbabe-Puro/14-3-3eta oder als Kontrolle mit pBabe-Puro exprimierenden Retroviren und 48h später gemäß dem in Abb. 14 gezeigten Selektions- und Expansionschema behandelt. Nach beendeter Selektion wurden die Zellen fixiert und mit Giemsa-Lösung angefärbt.

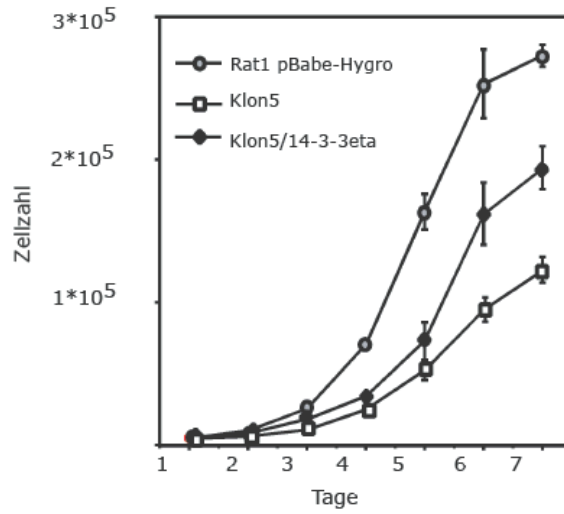
Zellkulturschalen dargestellt, die zeigen, daß die Zellklone, die zusätzlich zu der Expression von Miz1 eine Expression von 14-3-3eta oder cMyc aufweisen, verglichen zu dem Kontrollklon einen deutlichen Wachstumsvorteil besitzen. Dieses Ergebnis wurde durch die Erstellung einer Wachstumskurve von Rat1 Fibroblasten, die entweder mit Miz1 exprimierenden oder mit 14-3-3eta exprimierenden oder mit beiden Miz1 und 14-3-3eta exprimierenden Retroviren infiziert wurden. Miz1 und 14-3-3eta koinfizierte Rat1 Fibroblasten zeigten eine höhere Proliferationsrate als nur Miz1 infizierte Fibroblasten (siehe Abbildung 18a; Daten von M.Wanzel).

Die hemmende Wirkung von 14-3-3eta auf die Funktion von Miz1 ließ sich durch die Analyse eines Zellzyklusprofils (FACS) von HeLa Zellen näher untersuchen. Dazu wurden HeLa Zellen transient mit einem eGFP-Miz1 Fusionsprotein und mit 14-3-3eta kotransfiziert. Als Kontrollen wurden HeLa Zellen mit einem eGFP exprimierenden Vektor transient transfiziert. Die Analyse (siehe Abbildung 18b, Daten von M. Wanzel) ergab, daß im Vergleich zur Kontrolle 20% mehr Zellen durch die Expression von dem eGFP- Miz1 Fusionsprotein in der G1-Phase accumulierten. Dieser Miz1-abhängige Effekt wurde durch die Koexpression von 14-3-3eta um 10% reduziert. Daraus läßt sich schließen, daß 14-3-3eta einen inhibitorischen Effekt auf den Miz1 induzierten G1-Arrest ausübt.

4.2.3 14-3-3eta zeigt eine reprimierende Wirkung auf die Miz1 vermittelte Transaktivierung von p21^{Cip1}

Die Beobachtung, daß 14-3-3eta den Miz1 induzierten Wachstumsarrest in der G1-Phase hemmt, führte zu der Annahme, daß 14-3-3eta die Miz1-abhängige Transkription von p21^{Cip1} beeinflusst. Aus Studien ist bekannt, daß die wachstumshemmende Funktion von Miz1 durch die Induktion des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1} vermittelt wird. Um diese Frage zu beantworten, wurde eine semiquantitative RT-PCR Analyse durchgeführt. Dazu wurde RNA aus Rat1 Fibroblastenzellen, die eine Koexpression von Miz1 und 14-3-3eta aufwiesen, isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Als Kontrolle dienten Rat1 Fibroblastenzellen, die nur Miz1 exprimieren. Die Zellen mit einer Überexpression von Miz1 zeigen eine höhere p21^{Cip1} Expression im Vergleich zu Kontrollzellen (siehe Abbildung 19a; Daten von M. Wanzel). Die Zellen, die Miz1

a)



b)

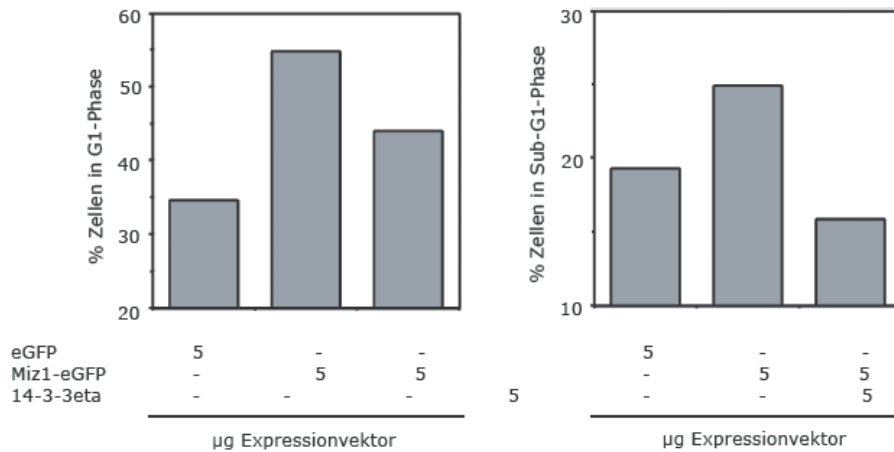


Abbildung 18: 14-3-3eta inhibiert den Miz1 induzierten Wachstumsarrest

- a) Dargestellt ist eine Wachstumskurve des Miz exprimierenden, langsam wachsenden Rat1 Klon 5 (siehe Screen), dem 14-3-3eta überexprimierenden Klon 5 und Kontroll-infizierten parental Rat1 Fibroblasten (Rat1 pBabe-Hygro). Am Tag 1 wurden $3,5 \cdot 10^5$ Zellen in Triplikaten ausplattiert. Über 7 Tage wurde die Zellzahl durch Auszählen bestimmt.
- b) FACS-Analyse von HeLa-Zellen nach Transfektion mit CMV-eGFP („enhanced green fluorescent protein“), CMV-Miz1-eGFP (am C-terminus von Miz1 fusioniertes eGFP) oder CMV-Miz1-eGFP zusammen mit CMV-14-3-3eta. Das Diagramm zeigt die Prozentzahlen der GFP-positiven Zellen in der G1-Phase (rechtes Diagramm) oder in der Sub-G1-Phase (linkes Diagramm).

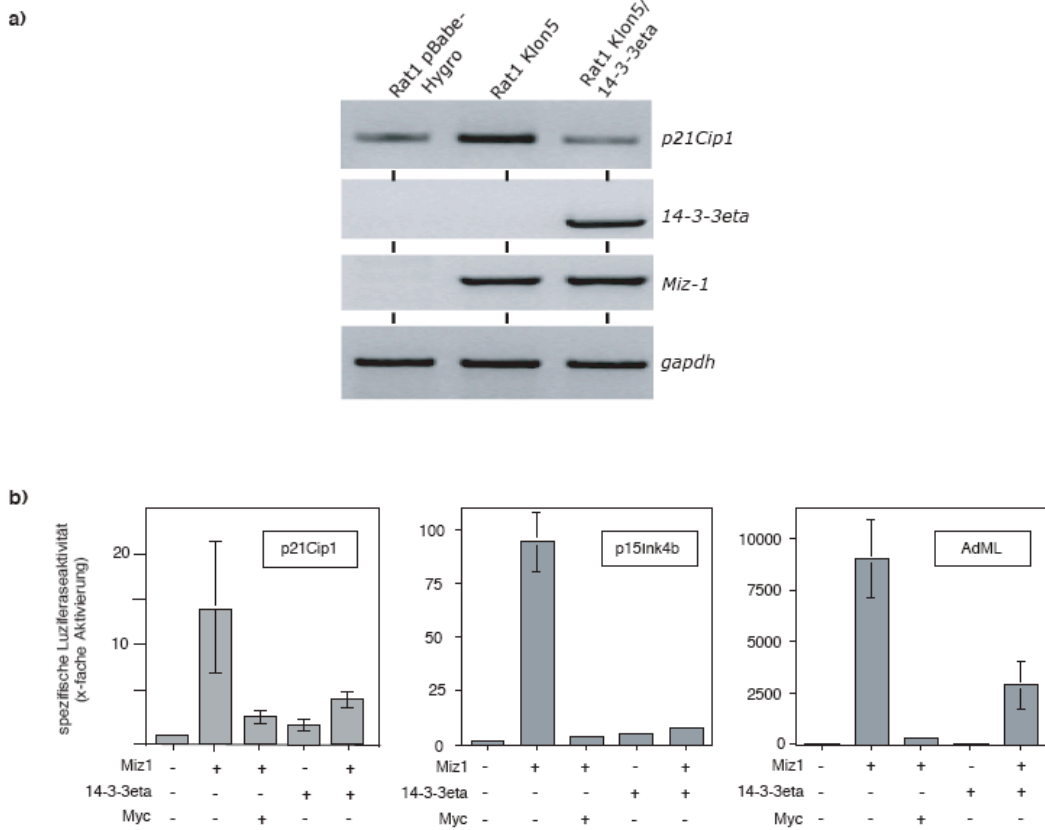


Abbildung 19: 14-3-3eta inhibiert die Miz1 induzierte p21Cip1 , p15 Ink 4b und AdML Expression

- a) RT-PCR Analyse der p21^{Cip1} und p15^{Ink4b} Expression in Miz1 oder Miz1/14-3-3eta überexprimierenden Zellklonen. Rat1Fibroblasten Zellen wurden mit Miz1 und 14-3-3eta exprimierenden Retroviren infiziert, selektioniert und klonal expandiert. Die aus diesen Klonen isolierte RNA wurde in cDNA transkribiert und mit p21^{Cip1}, Miz1, 14-3-3eta und Gapdh (Kontrolle) spezifischen Primern analysiert (Daten von M.Wanzel).
- b) Transiente Transfektion in HeLa Zellen mit Luziferase-Reporterplasmiden der p21^{Cip1}, p15^{Ink4b} und Adenovirus Major Late (AdML) Promotoren. CMV-Expressionsplasmide kodierend für Miz1, cMyc und Flag-14-3-3eta wurden wie in den Diagrammen angegeben kotransfiziert.

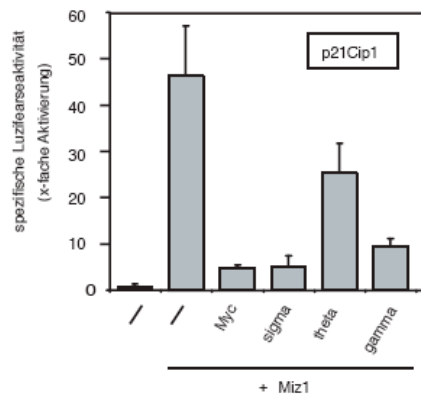


Abbildung 20: Die 14-3-3 vermittelte Repression der Transaktivierungsaktivität von Miz1 ist nicht spezifisch für eine Isoform der 14-3-3 Proteinfamilie

Transiente Transfektion eines p21^{Cip1} Luziferase-Reporterplasmid in HeLa Zellen. CMV-Expressionsplasmide kodierend für Miz1, 14-3-3 sigma, theta und gamma wurden wie angegeben kotransfiziert.

und 14-3-3eta koexprimieren, zeigen eine p21^{Cip1} Basalexpression wie die Kontrollzellen. Interessanterweise zeigt die Expression von 14-3-3eta keinen Einfluß auf die Miz1 RNA-Transkription. Daraus läßt sich folgern, daß die regulatorische Wirkung von 14-3-3eta in der Signalkaskade der Funktion von Miz1 übergeordnet ist. Dieser negative Effekt von 14-3-3eta ließ sich auch in Reporter-gen-Studien beobachten. Dazu wurden Luziferase-Reporter-genkonstrukte getestet, welche die Promotorregionen um die Transkriptionsstartpunkte der Miz1 Zielgene p21^{Cip1}, p15^{Ink4b} und AdML (Adenovirus Major Late) enthalten. HeLa-Zellen wurden in unabhängigen Triplikaten mit Miz1 und 14-3-3eta Expressionsplasmiden und dem entsprechenden Reporterkonstrukt transient transfiziert. Die Transfektionen mit einem c-Myc Expressionsplasmid diente als positive Kontrolle der Repression der Miz1 abhängigen Transaktivierung. Die Diagramme (Abbildung 19b) zeigen, daß die Miz1-abhängige Aktivierung aller getesteten Promotoren durch 14-3-3eta signifikant reprimiert wird und das mit einer der c-Myc Repression vergleichbaren Effizienz.

Ein Luziferase-Experiment unter Verwendung des p21^{Cip1} Luziferase-Reporterkonstrukts mit drei anderen Isoformen der 14-3-3 Proteinfamilie: sigma (σ), theta (τ) und gamma (γ) führten zu der Erkenntnis, daß die Hemmung der Miz1 abhängigen Transaktivierungsaktivität nicht spezifisch für die eta Isoform ist (siehe Abbildung 20). 14-3-3sigma und 14-3-3gamma weisen die gleiche Repressionsfähigkeit auf wie 14-3-3eta. Die theta Isoform erreicht ungefähr 25% der mit 14-3-3sigma und gamma erreichten Hemmung von Miz1. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß verschiedene 14-3-3 Isoformen die Transaktivierungsaktivität von Miz1 hemmen können.

4.2.4 Endogenes Miz1 assoziiert mit 14-3-3 Proteinen

14-3-3 Proteine liegen in homo- oder auch heterodimerer Form vor, erkennen spezifische Konsensusmotive ihrer Liganden und interagieren mit ihnen in einer phosphorylierungsabhängigen Weise (Meek *et al.*, 2004; Pozuelo *et al.*, 2004). Es existieren zwei sehr ähnliche Konsensusbindesequenzen die mit „Mode I“ und „Mode II“ (Rittinger *et al.*, 1999) bezeichnet werden (siehe Abbildung 21a). Analysen der Aminosäuresequenz von Miz1 mit Hilfe der Scansite Datenbank (www.scansite.mit.edu) ergaben zwei „Mode I“ Motive (siehe Abbildung 21b). Die

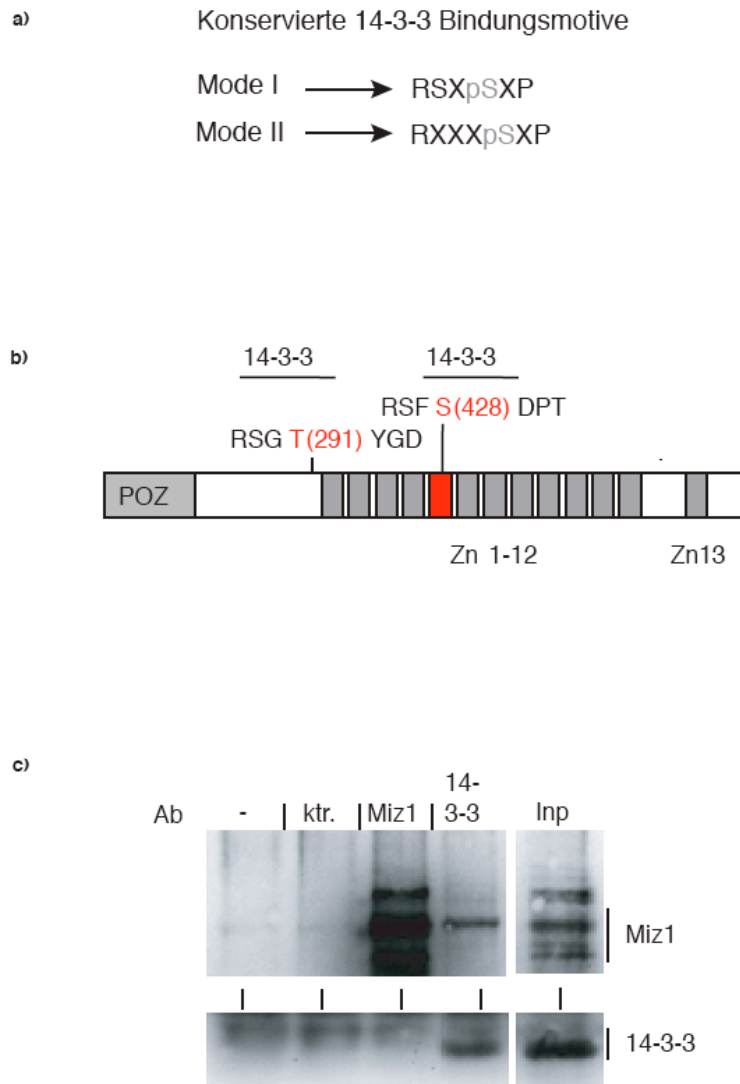


Abb. 21: Endogenes Miz1 interagiert direkt mit 14-3-3 Proteinen

- a) Schematische Darstellung der nach Rittinger *et al.* 1999 beschriebenen konservierten 14-3-3 Bindungsmotive Mode I und Mode II.
- b) Schematische Darstellung des Miz1 Proteins. Angegeben sind zwei putative 14-3-3 Bindungsmotive des Konsensus Typ Mode I um die Phospho-Aminosäuren Threonin291 und Serin428.
- c) Miz1 interagiert mit 14-3-3 Proteinen *in vivo*. Lysate von Ls174T Zellen wurden mit einem Miz1 und einem 14-3-3 pan Antikörper immunpräzipitiert. Die Spezifität der Immunpräzipitation wurde durch den Einsatz keines (-) oder eines unspezifischen Kontrollantikörpers (ktr.) geprüft. Der obere Teil zeigt einen gegen Miz1 und der untere Teil einen gegen 14-3-3 gerichteten Western-Blot. Als Ladekontrolle wurden 5% der eingesetzten Lysatmenge geladen.

erste potentielle Bindestelle liegt zwischen der POZ-Domäne und dem ersten Zinkfinger mit einem Threonin als phosphorylierbare Aminosäure an Position 291. Das zweite Motiv ist direkt im fünften Zinkfinger lokalisiert und besitzt als phosphorylierbare Aminosäure ein Serin an Position 428.

Zur Klärung einer möglichen Interaktion von endogenem Miz1 mit 14-3-3 wurden Immunopräzipitationen durchgeführt. Die eingesetzten Lysate wurden aus der epithelialen Kolonkarzinom Zelllinie LsT174T mittels Ultraschallbehandlung hergestellt und es wurde 1mg Gesamtprotein in die Immunpräzipitation eingesetzt. Die Proben wurden anschließend auf einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine im Western-Blot-Verfahren detektiert. Der gegen 14-3-3 Proteine gerichtete polyklonale Antikörper kopräzipitierte Miz1, wobei die niedriger molekulare 95 kD Bande verstärkt präzipitiert wurde (siehe Abbildung 21c). Jedoch konnten mit dem gegen Miz1 gerichteten monoklonalen Antikörper keine 14-3-3 Proteine präzipitiert werden. Ein Grund, daß der spezifisch gegen Miz1 gerichtete Antikörper keine mit 14-3-3 Proteinen assoziierten Miz1 Proteine immunpräzipitiert, könnte sein, daß das Epitop für den Antikörper im Miz1 Protein durch die Interaktion mit 14-3-3 maskiert ist. Eventuell erfolgt durch die Komplexierung mit 14-3-3 auch eine Konformationsänderung der Miz1 Struktur, so daß das Epitop für den Antikörper unzugänglich ist.

Ob diese direkte Protein-Proteinbindung über die in der Miz1-Sequenz gefundenen spezifischen 14-3-3 Erkennungsmotive vermittelt wird, wurde durch die Einführung verschiedener Mutationen in diese Bindemotive des Miz1 Proteins ermittelt. Unter Verwendung eines Mutagenese PCR-Systems (Stratagene) wurde im vorderen Erkennungsmotiv das Threonin 291 gegen ein Alanin ausgetauscht. Bei dem im fünften Zinkfinger lokalisierten Motiv wurde das Serin 428 einmal gegen Alanin und einmal gegen Asparaginsäure ersetzt. Der Austausch täuscht durch die negative Ladung der Asparaginsäure eine Phosphorylierung vor. Neben dem Austausch des potentiell phosphorylierbaren Serins 428, wurde in dem zweiten Motiv auch das benachbarte, ebenfalls konservierte und phosphorylierbare Serin 426 gegen die nicht phosphorylierbare Aminosäure Leucin ausgetauscht. Durch diesen Aminosäureaustausch sollte die Rolle des Serin 426 für die Funktionalität der Erkennungsmotive analysiert werden. Die so generierten Miz1 Mutanten wurden anschließend in eine Reporteranalyse mit einem p15^{Ink4b} Luziferasekonstrukt eingesetzt. Das die

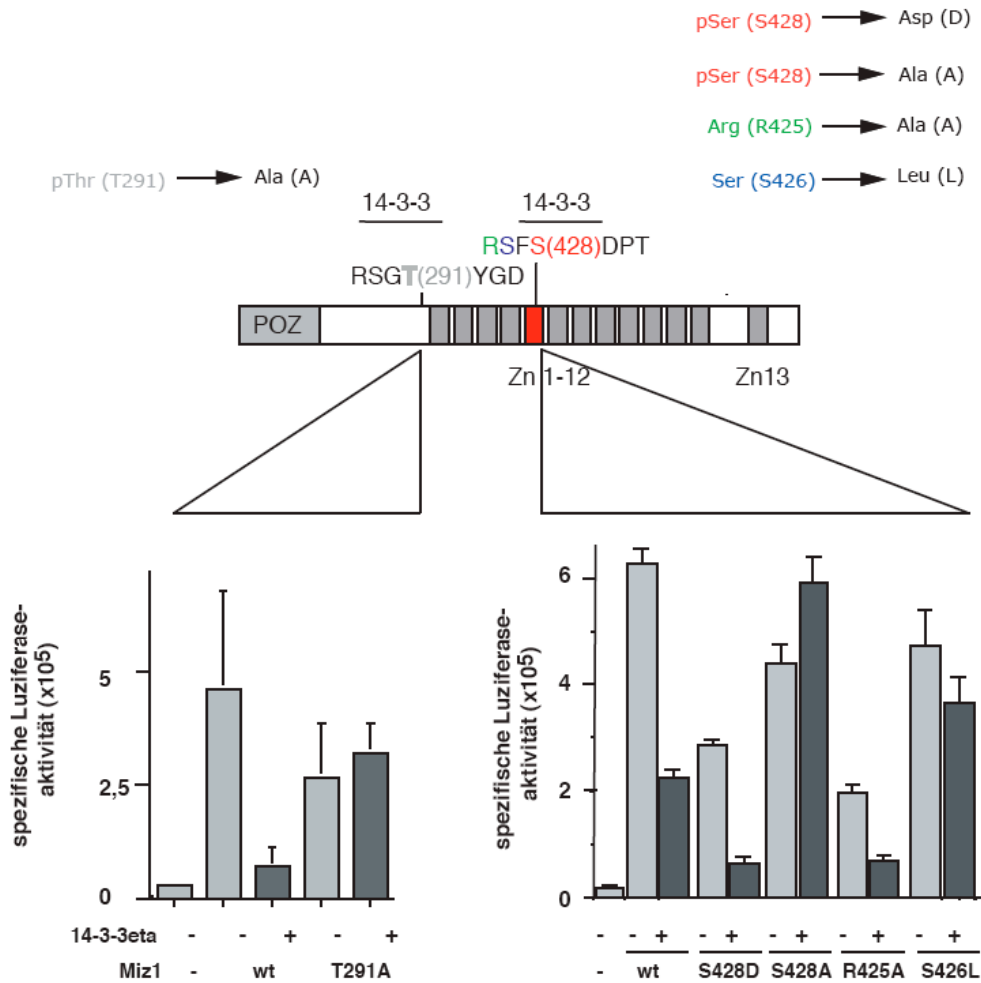


Abb. 22: Die 14-3-3 eta vermittelte Repression der Miz1 Transaktivierung aktivität ist abhängig von den zwei vorhandenen 14-3-3 Bindungsmotifen

- Schematische Darstellung der Miz1 Sequenz mit den zwei vorhandenen Mode I Motiven (s. Abb. 21a). Farblich hervorgehoben sind die in dieser Sequenz ausgetauschten Aminosäuren, um Miz1 Proteine mit Mutationen in der 14-3-3 Bindesequenz zu erzeugen. Bei den Miz1 Mutanten wurden die Phosphoaminosäuren Serin428 und Threonin291 und die benachbarten Aminosäuren Arginin425 und Serin 426 der beiden 14-3-3 Erkennungsmotive gegen die induzierten Aminosäuren ausgetauscht.
- Die Diagramme zeigen Luciferase-Reporterstudien unter Verwendung des p15^{Ink4b} Promoters. HeLa Zellen wurden transient mit verschiedenen CMV-Expressionsplasmiden kodierend für verschiedene Miz1 Mutanten (s. Abb. 22a) und 14-3-3 eta wie angegeben transfiziert.

spezifische Luziferseaktivität angebende Balkendiagramm demonstriert, daß die Expression von 14-3-3eta die Miz1-abhängige Transaktivierung des p15^{Ink4b} (siehe Abbildung 22b) sowie des p21^{Cip1} Promotors (Daten nicht gezeigt) hemmt. Der Austausch von Threonin 291 und Serin 428 gegen Alanin vermindert diesen inhibitorischen Effekt von 14-3-3eta auf die Transaktivierung deutlich. Die Miz1-Mutante, bei der das Serin 428 gegen eine Asparaginsäure ausgetauscht wurde, weist eine etwas niedrigere Aktivierungsaktivität auf und ist immer noch reprimierbar durch 14-3-3eta. Die Transaktivierung der Promotoren durch die Miz1 Serin 426 Leucin Mutante war dagegen nur schwach durch 14-3-3eta gehemmt. Insgesamt betrachtet, zeigen die Daten, daß 14-3-3eta die Funktion von Miz1 durch die Interaktion mit den beiden ermittelten Erkennungsmotiven inhibiert, und daß diese Inhibition anscheinend abhängig von der Phosphorylierung der beiden Aminosäuren Threonin 291 und Serin 428 ist.

4.2.5 14-3-3 eta verhindert die Bindung von Miz1 an die DNA

Nachdem gezeigt werden konnte, daß Miz1 und 14-3-3eta einen Komplex *in vivo* bilden können, wodurch der Miz1 induzierte Wachstumsarrest unterbunden wird, sollte im Folgenden nach dem Mechanismus dieser Inhibition gesucht werden. Aufgrund der Erkenntnis, daß 14-3-3 Proteine oftmals als Transportproteine fungieren, indem sie ihre Liganden überwiegend vom Nukleus ins Zytoplasma, aber auch in die umgekehrte Richtung, translozieren (Tzivion und Avruch, 2001), wurden Immunfluoreszenzen durchgeführt. Es sollte dabei ermittelt werden, ob Miz1 und 14-3-3eta kolokalisieren und ob 14-3-3eta die Lokalisation von Miz1 in der Zelle verändert. Dazu wurden HeLa Zellen mit Miz1 und mit Flag-markiertem 14-3-3eta transient transfiziert. Aufgrund des Mangels eines 14-3-3eta Antikörpers, der in der Immunfluoreszenz ein spezifisches Signal zeigt, wurde ein Flag-14-3-3eta Expressionsplasmid benutzt. Somit konnte die 14-3-3eta Expression über die Flag-Markierung detektiert werden.

48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und mit monoklonalen Antikörpern, die gegen Miz1 und die Flagprotein-Markierung gerichtet waren, inkubiert. Miz1 wurde über Cy3-gekoppelte und Flag-markiertes 14-3-3eta über FITC-gekoppelte Sekundäntikörper detektiert. Die mikroskopischen Immunfluoreszenz-

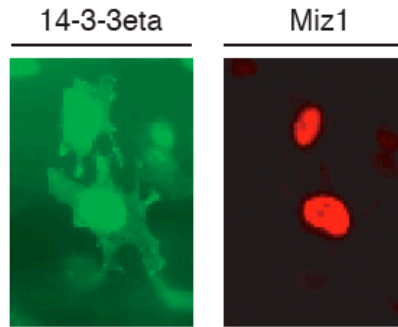


Abbildung 23: 14-3-3eta beeinflusst nicht die zelluläre Lokalisation von Miz1
 Immunfluoreszenz-Bilder von Flag-14-3-3eta exprimierenden HeLa Zellen zeigen, daß 14-3-3eta keine Lokalisierungsänderung der Miz1 Proteine vom Nucleus ins Zytoplasma bewirkt.

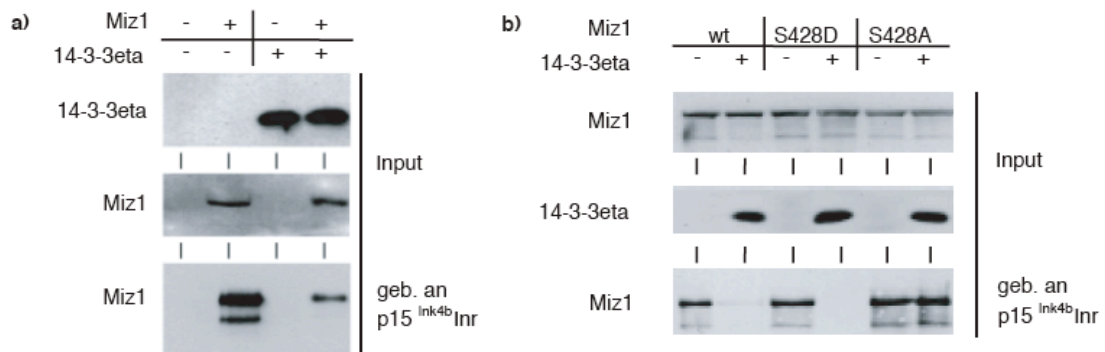


Abb.24: 14-3-3eta inhibiert die Bindung von Miz1 an die DNA

- a) HeLa Zellen wurden transient transfiziert mit Expressionsplasmid kodierend für Miz1 entweder allein oder zusammen mit einem Flag-14-3-3 eta Expressionsplasmid. Die Zellen wurden lysiert und mit biotinylierten Oligonukleotiden, die den Transkriptionstartbereich des p15^{Ink4b} Promoters repräsentieren, inkubiert. Dargestellt sind Western-Blots, welche die Mengen an DNA gebundenem Miz1 und die Input-Ladung zeigen.
- b) Wiederholung des Experimentes beschrieben unter a) mit verschiedenen Miz1-S428 Mutanten. Die S428A Mutante kann (s. Abb. 22a) nicht durch 14-3-3eta reprimiert werden.

aufnahmen (siehe Abbildung 23) zeigen deutlich, daß 14-3-3eta das überwiegend nukleär vorkommende Miz1 nicht ins Zytoplasma verschiebt. Somit scheint eine Translokation der im Kern als Transkriptionsfaktor aktiven Miz1 Proteine durch 14-3-3 Proteine nicht der Inhibitionsmechanismus zu sein.

Die Bilder zeigen für die Flag-markierten 14-3-3eta Proteine ein diffuses Verteilungsmuster im Zytoplasma und im Nukleus, wobei sich eine stärkere Lokalisierung der 14-3-3eta Proteine im Nukleus abzeichnet. Die Lokalisierung der 14-3-3 Proteines wird sonst eher als stärker zytoplasmatisch beschrieben ist. Dieses könnte eine Konsequenz der Überexpression sein, aber auch auf die Interaktion mit Miz1 zurückzuführen sein, weil auch die Liganden die Lokalisierung der 14-3-3 Proteine beeinflussen können (Paul *et al.*, 2005).

Die Position der 14-3-3 Erkennungsmotive direkt vor oder in den Zinkfingern von Miz1 führte zu der Hypothese, daß 14-3-3eta die Bindung von Miz1 an die DNA unterbinden könnte. Dieses wurde in DNA-Bindungsstudien („Oligonucleotid-pulldown“) mittels Biotin-gekoppelten Oligonukleotiden, welche die Initiatorsequenz des p15^{Ink4b} Promotors umfassen, untersucht. Dazu wurden HeLa Zellen transient mit Expressionsplasmiden für Miz1, die Miz1 Mutanten S428A und S428D und 14-3-3eta transfiziert. Die präparierten Gesamtzelllysate wurden anschließend mit den biotinylierten Oligonukleotiden und Streptavidin-Agarose zur Präzipitation inkubiert. Die Detektion der Proteine erfolgte nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem SDS-Gel mittels Western Blot Verfahren. Die Analyse zeigte (siehe Abbildung 24a), daß die Koexpression von 14-3-3eta die Bindung von Miz1 an das Initiatorelement des p15^{Ink4b} Promotors verhinderte. Die DNA Bindung der Miz1 Mutante S428AD konnte ebenfalls durch 14-3-3eta inhibiert werden, jedoch nicht die Bindung der S428A Mutante (siehe Abbildung 24b). 14-3-3eta hemmt Miz1 folglich durch Verhinderung der Bindung von Miz1 an die DNA durch Blockierung der Zinkfingerdomäne.

4.2.6 Die Serin-Threonin Kinase Akt phosphoryliert Miz1 am Serin 428 *in vivo* und *in vitro*

Das Wissen, daß 14-3-3 Proteine in der Regel nur phosphorylierte Konsensusmotive ihrer Liganden binden, führte zu der Analyse der Miz1 Sequenz

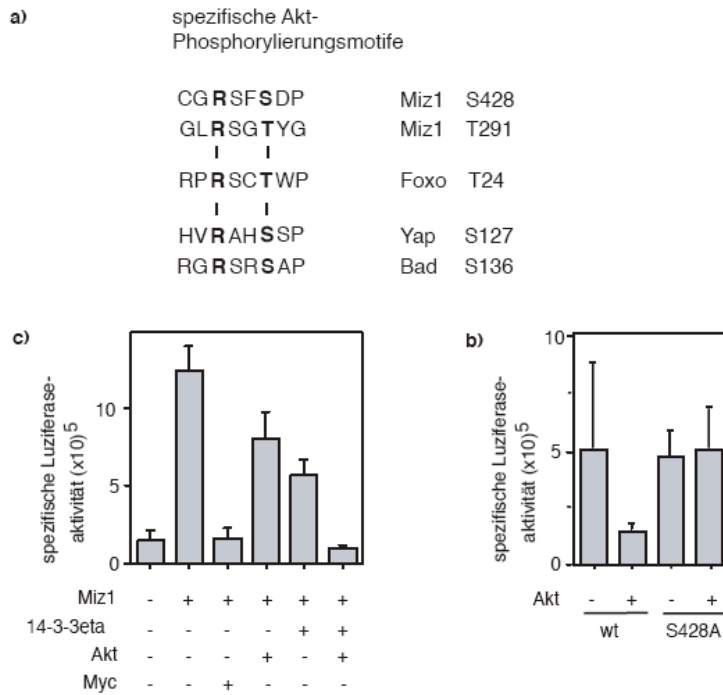


Abb. 25: Akt kooperiert mit 14-3-3eta bei der Hemmung der Transaktivierungsaktivität von Miz1

- a) Vergleich der Akt Phosphorylierungsmotive in Miz1 und bekannten Akt Zielproteinen. Dargestellt ist die Miz1 Sequenz um die Phosphoamino-säuren Serin428 und Threonin291 und die bekannten Akt Erkennungsmotive in den angegebenen Proteinen.
- b) Transiente Transfektion eines p15^{Ink4a} Luziferase-Reporterplasmid in HeLa Zellen. CMV-Expressionsplasmide kodierend für Miz1, 14-3-3 eta und Myr-Akt wurden wie angegeben ko-transfiziert.
- c) Akt inhibiert die Transaktivierung von wt Miz1 aber nicht der Miz1 S428A Mutante. Transientes Reporterexperiment unter Verwendung des p15^{Ink4a} Promoters in HeLa Zellen. CMV-Expressionsplasmide für wt Miz1 und Miz1S428A wurden jeweils mit und ohne einem CMV-Expressionsplasmid für Myr-Akt transfiziert.

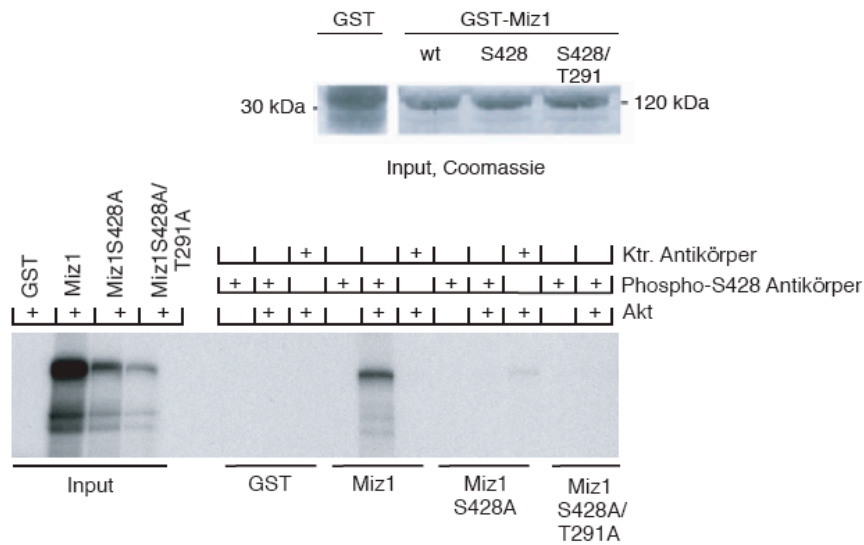


Abb. 26: Phosphorylierung von Miz1 durch Akt *in vitro*

Ein phosphospezifischer Antikörper erkennt spezifisch am Ser428 phosphoryliertes Miz1. Isolierte GST-wt Miz1 und GST-Miz1S428A Proteine wurden durch rekombinantes Akt in Anwesenheit von ³²P-ATP phosphoryliert. Anschliessend wurden die Miz1 Wildtyp und mutierten Proteine mit Hilfe des S428 spezifischen Phospho-Antikörpers imm un präzipitiert und mittels Autoradiogramm analysiert.

nach potentiellen Kinase-Erkennungselementen. Die in Abbildung 25a aufgelisteten Sequenzen zeigen einen Vergleich zwischen den zwei Miz1 Motiven um Threonin 291 und Serin 428 und bekannten Akt Erkennungsstellen (www.scansite.mit.edu). Die beiden Miz1 Motive weisen eine basische Aminosäure an Position -3 relativ zur Phosphorylierungsstelle auf, was eine Bedingung für die Phosphorylierung durch die Serin-Threonin Kinase Akt ist. Jedoch fehlt beiden Erkennungssequenzen eine basische Aminosäure an Position -5, welche in vielen aber nicht allen Motiven bekannter Akt-Substrate vorkommt.

In Reporterstudien wurde zunächst ein eventueller repressiver Einfluß der Kinase Akt auf die Transaktivierungsaktivität von Miz1 auf den p15^{Ink4b} Promotor getestet. HeLa Zellen wurden dazu mit Expressionsplasmiden für Miz1, 14-3-3eta und konstitutiv-aktivem Akt in den angegebenen Kombinationen (siehe Abbildung 25b) transient transfiziert. Die Auswertung der spezifischen Luziferaseaktivität ergab, daß Akt mit 14-3-3eta in der Inhibition der Transaktivierungsaktivität von Miz1 kooperiert. Dieses läßt vermuten, daß Akt die hemmende Wirkung von 14-3-3eta auf die Funktion von Miz1 verstärkt. Die S428A Miz1 Mutante dagegen läßt sich durch die Expression von konstitutiv-aktivem Akt nicht inhibieren (siehe Abbildung 25c).

Um die Phosphorylierung von Miz1 am Serin 428 *in vivo* und *in vitro* genauer untersuchen und charakterisieren zu können, wurde ein polyklonales Antiserum hergestellt. Dazu wurden Kaninchen mit einem elf Aminosäure langen Phosphopeptid, welches die Sequenz um das Serin 428 repräsentiert, immunisiert (Eurogentec). Das Antiserum wurde affinitätschromatographisch gereinigt.

Zunächst wurde getestet, ob das Antiserum das phosphorylierte Serin 428 des Miz1 Proteins spezifisch erkennt. Dazu wurden GST-Miz1 Fusionsproteine oder die in den Phosphorylierungsmotiven mutierten GST-Miz1S428A und GST-Miz1S428A/T291A Fusionsproteine mit rekombinantem Akt in Anwesenheit von ³²P markiertem ATP inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mit dem gegen phosphoryliertes Serin 428 gerichteten Antiserum immunpräzipitiert und im Autoradiogramm analysiert. Zur negativen Kontrolle der Akt-abhängigen Phosphorylierung wurden Proben ohne rekombinantes Akt inkubiert und als negative Antikörperkontrolle diente das Prä-immunserum. Das in Abbildung 26 dargestellte Autoradiogramm zeigt, daß der gegen phosphoryliertes Serin 428 gerichtete Antikörper spezifisch die Wildtyp GST-Miz1 Fusionsproteine, aber nicht die mutierten GST-Miz1 Fusionsproteine, nach Inkubation

mit rekombinantem Akt immunpräzipitiert. Dieses belegt zum einen die Spezifität des Antiserums, zum anderen aber auch, daß Akt die Miz1 Proteine am Serin 428 *in vivo* phosphoryliert.

Mit Hilfe des phosphospezifischen Antikörpers konnte ebenfalls die *in vivo* Phosphorylierung von Miz1 am Serin 428 durch die Kinase Akt untersucht werden. Dazu wurden Kolonkarzinom Zellen (LsT174T) durch Serumreduktion synchronisiert. Durch den Serumentzug werden die Wachstumsfaktor-abhängigen Signalwege wie der PI3-Kinase Signalweg gehemmt und die Zellen arretieren in der G1-Phase des Zellzykluses. Dieses ermöglicht es, die Phosphorylierungsereignisse der PI3-Kinase Signalkaskade zu untersuchen und durch Zugabe von spezifischen Inhibitoren zu unterbinden. Um im Folgenden die PI3-Kinase/ Akt abhängige Phosphorylierung der endogenen Miz1 Proteine zu untersuchen wurden die synchronisierten LsT174T Zellen für verschiedene Zeiten mit Serum restimuliert. Parallel wurde ein Teil der Zellen vor der Zugabe des Serums mit dem spezifischen PI3K-Inhibitor LY 294002 (Calbiochem) oder einem spezifischen Akt Inhibitor (11-6Hydroxymethyl-chiro-inositol2[(R)-2-O-methyl-O-octadecylcarbonate]; Calbiochem) behandelt. Als Kontrolle wurde der mTor spezifische Inhibitor Rapamycin eingesetzt, um auszuschließen, daß die Phosphorylierung von Miz1 nicht durch mTor, sondern durch Akt direkt erfolgt.

Nach der Behandlung mit den verschiedenen Inhibitoren wurden Proteinlysate durch Ultraschallbehandlung erstellt und die Proben wurden mit dem gegen phosphoryliertes Miz1 gerichteten Antiserum immunpräzipitiert. Die Proteine wurden nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem SDS-Gel im Western-Blot-Verfahren mit einem monoklonalen Antikörper gegen Miz1 detektiert. Die Immunblots (siehe Abbildung 27a+b) demonstrieren, daß Miz1 auch *in vivo* am Serin 428 phosphoryliert ist und das nach Vorbehandlung der Zellen mit dem PI3-Kinase Inhibitor wie auch mit dem Akt-Inhibitor die Wachstumsfaktor-abhängige Phosphorylierung signifikant reduziert ist. Der mTor spezifische Inhibitor verändert die Phosphorylierung nicht (Abb. 27b). Dieses führt zu dem Schluß, daß Miz1 *in vivo* und *in vitro* durch einen PI3-Kinase/Akt abhängigen Signalweg phosphoryliert wird.

Um die spezifische Phosphorylierung von Miz1 durch Akt zu bestätigen wurde ein myristoyliertes Akt und ein Hormon induzierbares Akt Protein eingesetzt. Das Myristoylierungssignal befindet sich am C-terminus des Akt Proteins und verankert

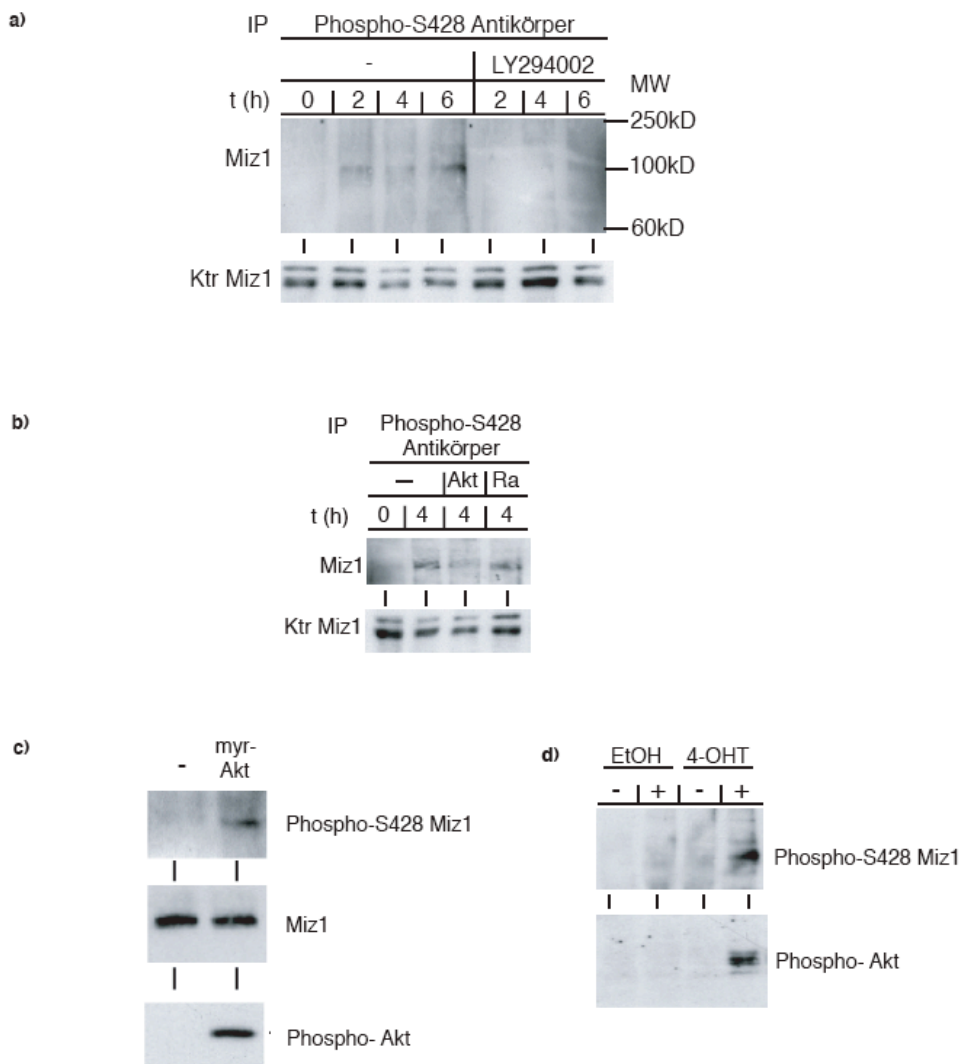


Abb. 27: Akt phosphoryliert Miz1 *in vivo*.

- a) Ls174T Zellen wurden Serum gehungert und für die angegebenen Zeiträume mit Serum restimuliert in der Anwesenheit von DMSO oder des PI3-Kinase Inhibitors LY294002. Die Lysate wurden mit einem S428 phosphospezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Dargestellt ist ein Westernblot der immunpräzipitierten Proben mit einem Miz1 spezifischen Antikörper. Als Kontrolle (Ktr Miz1) wurden 5% des Inputs geladen und mit einem Miz1 spezifischen Antikörper analysiert
- b) Die *in vivo* Phosphorylierung von Miz1 ist Akt aber nicht mTor abhängig. Ls174T Zellen wurden Serum gehungert und für 4 Stunden mit Serum restimuliert in Anwesenheit von DMSO, dem Akt spezifischen Inhibitor 1L-6-Hydroxymethyl-chiroinositol2-(R)-2-O-methyl-O-octadecylcarbonat (Akt) oder dem mTor spezifischen Inhibitor Rapamycin (Ra). Die Lysate wurden mit einem S428 phosphospezifischen Antikörper immunpräzipitiert und mit einem Miz1 spezifischen Antikörper analysiert. Als Kontrolle (Ktr Miz1) wurden 5% des Inputs mit einem Miz1 spezifischen Antikörper analysiert.
- c) HeLa Zellen wurden mit einem CMV Myr-Akt Expressionsplasmid transfiziert und 36h später die Lysate mit einem Miz1 S428 phosphospezifischen Antikörper im Western-Blot analysiert. Als Kontrolle diente ein CMV-Leervektor (-).
- d) Humanes Miz1 exprimierende NIH3T3 Zellen wurden mit rekombinanten Akt-ER exprimierenden Retroviren infiziert. Die Zellen wurden Serum gehungert und mit 4-OHT oder als Kontrolle mit Ethanol für 6h stimuliert. Die Zellsate wurden mit einem S428 phosphospezifischen Antikörper immunpräzipitiert und mit einem Miz1 spezifischen Antikörper analysiert. gezeigt ist ebenfalls ein Westernblot gegen phosphoryliertes Akt.

Akt permanent mit der Zellmembran, wodurch die Wahrscheinlichkeit der Phosphorylierung durch die PI3-Kinase erhöht ist. Bei dem hormoninduzierbaren Expressionssystem wurde die Akt cDNA mit einer Hormonbindedomäne eines murinen Östrogenrezeptors fusioniert (Akt-ER Chimere). Das Fusionsprotein wird durch die Zugabe des synthetischen Steroids 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT), das an die Hormonbindedomäne bindet, aktiviert.

NIH3T3 Zellen, die ektopisch humanes Miz1 exprimieren, wurden mit Expressionsplasmiden, die eine Akt-ER-Chimere oder ein am C-terminus myristoyliertes Akt exprimieren, retroviral infiziert. Die Zellen wurden durch Serumentzug synchronisiert. Die Akt-ER Chimere wurde später für verschiedene Zeitpunkte mit 4-Hydroxy-Tamoxifen induziert. Die präparierten Zellysate wurden elektrophoretisch aufgetrennt und phosphoryliertes Miz1 im Western Blot Verfahren mit dem gegen phosphoryliertes Serin 428 gerichteten polyklonalen Antiserum detektiert. Phosphoryliertes Miz1 war detektierbar in den Zellen, die myristoyliertes Akt überexprimieren, aber nicht in den Kontrollen (siehe Abbildung 27c). Die Induktion der Akt-Östrogenrezeptorchimere durch Zugabe von 4-Hydroxy-Tamoxifen führten ebenfalls zu einer rapiden Phosphorylierung von Miz1 (siehe Abbildung 27d), aber nicht die alleinige Zugabe des benutzten Lösungsmittel Ethanol.

Um die Akt-abhängige Phosphorylierung von Miz1 auf physiologischer Ebene zu belegen, wurden *in vivo* metabolische-Markierungs-Experimente mit ^{32}P -Ortho-Phosphat durchgeführt. Dazu wurde Akt-ER-Chimere exprimierenden NIH3T3 Zellen zunächst das Serum reduziert und die Zellen in phosphatfreiem Medium kultiviert. Gleichzeitig mit der Serumrestimulation wurde dem Medium ^{32}P -Ortho-Phosphat zugegeben, entweder in Gegenwart oder Abwesenheit von 4-Hydroxy-Tamoxifen. Ein Teil der Zellysate wurden mit einem gegen Miz1 gerichteten monoklonalen und der andere Teil mit dem phosphoryliertes Miz1 erkennenden polyklonalen Antiserum immunpräzipitiert. Danach wurden die Proben wurden einer SDS-PAGE Elektrophorese unterzogen. Das Autoradiogramm in Abbildung 28 zeigt eine verstärkte Präzipitation von ^{32}P -Phosphat markiertem Miz1 nach Induktion der Akt-Östrogenrezeptorchimere durch 4-Hydroxy-Tamoxifen.

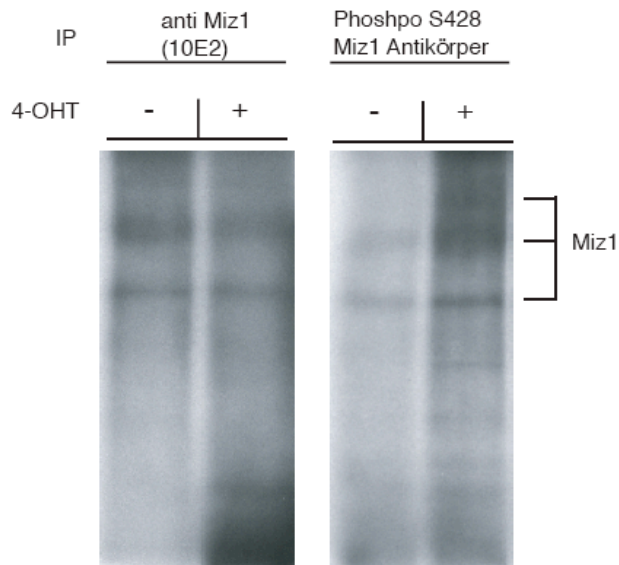


Abb. 28: Metabolische Markierung von Akt-ER exprimierenden Zellen mit ^{32}P -Orthophosphat
 Serum und Phosphat gehungerte NIH3T3 Zellen die ein hormoninhibierbares Akt-ER Protein exprimieren wurden 6h mit ^{32}P -Orthophosphat (1mCi/ml) in Anwesenheit oder Abwesenheit von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) kultiviert. Die eine Hälfte des Zellysates wurde mit einem Miz1 spezifischen, die andere Hälfte mit einem S428 phosphospezifischen Antikörper immunpräzipitiert und mittels Autoradiogramm analysiert. Die Miz1 spezifischen Banden sind gekennzeichnet.

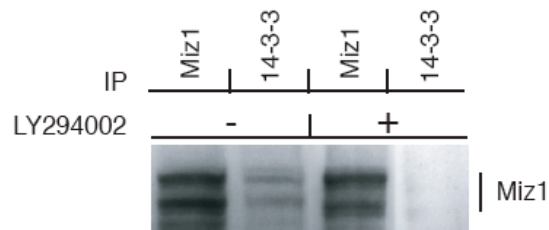


Abb. 29: Die Interaktion von Miz1 und 14-3-3 ist in vivo abhängig von Akt
 Ls147T Zellen wurden Serum gehungert und für 6h mit 10% Serum restimuliert, entweder in der Anwesenheit oder Abwesenheit des PI3 Kinase Inhibitors LY294002. Die Zellysate wurden mit einem gegen Miz1 gerichteten oder einem gegen alle 14-3-3 Isoformen gerichteten Antikörper (14-3-3 pan) immunpräzipitiert und anschließend im Western-Blot mit einem Miz1 spezifischen Antikörper analysiert.

4.2.7 Die Interaktion von 14-3-3eta und Miz1 ist abhängig von der Phosphorylierung durch Akt *in vitro* und *in vivo*

Nach dem experimentell gezeigt worden war, daß Akt Miz1 Wachstumsfaktor-abhängig phosphoryliert, war die Bedeutung dieser Phosphorylierung für die Regulation der Komplexbildung von 14-3-3eta mit Miz1 unklar. Aus diesem Grund wurde eine *in vivo* Studie durchgeführt. Exponentiell wachsende LsT174T Zellen, wurden Serum gehungert. Ein Teil wurde direkt durch Zugabe von Serum restimuliert und ein und der andere Teil wurde vor Serumzugabe eine Stunde mit dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 vorbehandelt. Anschließend wurden die Proteine beider Ansätze mit einem gegen Miz1 gerichteten und einem gegen alle 14-3-3 Isoformen gerichteten Antikörper immunpräzipitiert (siehe Abbildung 29). Die immunpräzipitierten Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und im Western-Blot Verfahren mit einem gegen Miz1 gerichteten Antikörper analysiert. Die Ergebnisse zeigen, daß die Interaktion von Miz1 und 14-3-3 nach Hemmung der PI3-Kinase Aktivität inhibiert ist. Diese Beobachtung stimmt mit *in vitro* Daten überein, die mit Hilfe von rekombinanten Flag-markierten 14-3-3eta Proteinen und verschiedenen Glutathione-S-Transferase-Miz1 Fusionsproteinen (GST-Miz1, GST MizS428A und GST Miz S428A/T291A) erhalten wurden (Daten von M. Wanzel, nicht gezeigt). Die wildtyp und mutierten Miz1-GST Fusionsproteine wurden an Glutathione-S-Transferase gekoppelte Sepharose gebunden und mit rekombinatem Akt und ³²P-ATP inkubiert. Anschließend wurden die Fusionsproteine isoliert und zu den immobilisierten 14-3-3eta-Flag Proteinen gegeben. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiogramm analysiert. Das Autoradiogramm zeigte, daß nur Wildtyp Miz1 und keine der Mutanten (GST Miz1 S428A und GST Miz1 S428A/T291A) an die immobilisierten 14-3-3eta-Flag Proteine bindet.

Zusammenfassend zeigen die Daten, daß die Bindung von 14-3-3eta und Miz1 von einer vorhergehenden Phosphorylierung durch die PI3-Kinase/ Akt Signalkaskade abhängt.

5. Diskussion

5.1 Screening-Verfahren als Methode zur Identifizierung neuer Interaktionspartner

5.1.1 Identifizierung von Inhibitoren der Wachstumsarrest induzierenden

Funktion von Miz1

Innerhalb dieser Arbeit wurde ein retrovirales Screen-Verfahren zur Identifizierung neuer Inhibitoren des Miz1 induzierten Wachstumsarrestes etabliert, um die biologische Funktion dieses Transkriptionsfaktors näher zu charakterisieren und zu verstehen. Eine durch retrovirale Infektion erzeugte Überexpression von Miz1 in Rat1-Fibroblastenzellen zeigte in Kolonie-Wachstumsversuchen, daß Miz1 zu einer starken Hemmung der Koloniebildung (siehe Abbildung 5) führt. Dieses resultiert aus einem Miz1 induzierten Arrest der Zellen in der G1-Phase (Staller *et al.*, 2001). Das Tumorsuppressorprotein pRb wurde als Effektor der Induktion des Zellzyklusarrestes in der G1-Phase identifiziert, dessen Funktion durch den Myc-Miz1 Komplex negativ reguliert wird (Staller *et al.*, 2001). Daher wurde zunächst angenommen, daß pRb das einzige Zielprotein des Myc-Miz1 Komplex in diesem Zusammenhang ist.

Es wurde gezeigt, daß Miz1 an der transkriptionellen Kontrolle des $p15^{Ink4b}$ und des $p21^{Cip1}$ Gens beteiligt ist. Der durch diese Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren induzierte Wachstumsarrest kann durch die Expression des Onkogens E7 (humanes Papillomavirus Typ 16; HPV16), daß an pRb bindet und dessen Funktion hemmt, überwunden werden. Infektionen von Miz1 überexprimierenden Rat1-Fibroblastenzellen mit Retroviren, welche die transformierenden Onkogene E7, E1A des Adenovirus und Large T (large tumour antigen) des SV40 Virus exprimieren, um selektiv mit der Funktion von den bekannten Wachstumsinhibitoren p53, pRb und $p21^{Cip1}$ zu interferieren, zeigten keine verstärkte Kolonienbildung in Wachstumsversuchen (Wanzel *et al.*, 2005). Auch die Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl2 hatte keinen hemmenden Effekt auf den Miz1 induzierten Wachstumsarrest. Allein die Überexpression von c-Myc, ein die Zellproliferation stimulierendes Protein, konnte die wachstumshemmenden Effekte von Miz1 überkommen. Diese Beobachtung stimmt mit vorhergehenden Studien

überein, die zeigten, daß die Expression von p21^{Cip1} in Zellen mit erhöhter Myc Expression inhibiert ist.

Diese Daten führten zu der Vermutung, daß wesentliche Aspekte der Biologie des Miz1 Proteins noch nicht verstanden sind. Zum einen ergab sich die Fragestellung, ob es weitere Gene neben Myc gibt, die den Miz1 induzierten Wachstumsarrest inhibieren können. Zum anderen war unklar, ob die wachstumshemmende Funktion von Miz1 vielleicht unabhängig von dem p53/p21^{Cip1} Signalweg und pRb ist, was durch die oben beschriebenen Ergebnisse der retroviralen Infektionen angedeutet wird. Bisher wurde angenommen, daß die Induktion des Zellzyklusarrestes in der G1-Phase nach DNA-Schädigung vollständig von der p53/p21^{Cip1} und den Pocket-Proteinen pRb, p107 und p130 abhängt (Waldmann *et al.*, 1995 & Harrington *et al.*, 1998).

Das p21^{Cip1} für die Miz1 abhängige Unterdrückung der Zellkolonie Ausbildung nicht benötigt wird, zeigen Ergebnisse aus Untersuchungen an p21^{Cip1} defizienten 3T3 Fibroblastenzellen, die nach retroviraler Miz1 Überexpression in Wachstumsversuchen im Vergleich zu p21^{Cip1} Wildtyp-Zellen kein verstärktes Kolonienwachstum aufwiesen (Wanzel *et al.*, 2005).

Das Miz1 für die Induktion des G1-Arrestes eine essentielle Rolle spielt, läßt sich an DNA geschädigten Zellen beobachten. Miz1 defiziente Zellen mit p53 Wildtypstatus zeigen nach UVB Behandlung eine stark verminderte p21^{Cip1} Induktion und vermögen nicht mehr in den G1-Phase Arrest zu gehen. Diese Zellen zeigen im Vergleich zu parentalen Zellen eine erhöhte Apoptoserate (M. Wanzel, unveröffentlichte Daten).

Die Tatsache, daß die Überexpression von Miz1 einen gut definierbaren und reproduzierbaren Phänotyp aufweist, ermöglicht den Aufbau eines genetischen Screen-Verfahrens mit einer cDNA Expressionsgenbank. Diese Art von genetischem Screen beinhaltet einen Zugewinn bestimmter Funktionen für die Zelle durch die Einbringung von exogenem genetischem Material. Die Expression dieser Gene ist verbunden mit Veränderungen des zellulären Phänotyps, der oft einfach in einer Zellpopulation selektioniert werden kann. In diesem Screen wurden Zellen nach ihrem erworbenen Potential selektioniert, den Miz1 vermittelten Wachstumsarrest zu überwinden und Kolonien auszubilden.

Der Vorteil einer retroviralen cDNA Expressionsverfahren gegenüber anderen Screen-Verfahren liegt daran, daß sie eine effiziente Methode darstellt, um genetisches Material stabil in das Genom von Säugerzellen zu integrieren. Diese komplexen cDNA Banken lassen sich nahezu in alle Zellarten effizient transferieren. Es kann eine relativ hohe Transduktionsrate erreicht werden, die von der Transfizierbarkeit der Zellen nicht limitiert wird. Die spätere Amplifizierung und Isolierung der retroviral übertragenen cDNA-Insertionen mittels PCR-Technik wird durch eine geringe Anzahl integrierter cDNA Sequenzen im Zellgenom erleichtert.

In dem unter 4.1.1 aufgeführten Verfahren konnten nach dem primären Screen insgesamt 9 proliferierende Zellklone isoliert werden. Da in diesem Screen nach retroviraler Infektion mit einer komplexen cDNA Expressionsbibliothek nur eine relativ geringe Anzahl von Zellen mit verändertem Phänotyp identifiziert wurde, ist es wichtig zu überprüfen, daß der neu isolierte Phänotyp tatsächlich durch die im retroviralen Vektor integrierte cDNA verursacht wird. Dazu wurde eine zweite Selektion durchgeführt. Die im sekundären „Screen“ (siehe Abbildung 7) mit Hilfe von Mouse Moloney Viren mobilisierten und in parentale Rat1-Fibroblasten transferierten cDNA-Insertionen der neun Klone zeigten einen reproduzierbaren Phänotyp im Koloniewachstumsversuch nach erneuter Überinfektion mit Miz1 und folgender Hygromycin-Selektion (siehe Abbildung 9). Es gab kaum einen Unterschied zwischen der Anzahl von Kolonien die nach Miz1 Überinfektion und Hygromycin-Selektion heranwachsen oder Kolonien die nach alleiniger Hygromycin-Selektion entstanden (siehe Tabelle 4). Daraus läßt sich zum einen folgern, daß cDNA Fragmente isoliert wurden, die signifikant den durch Miz1 Überexpression induzierten Phänotyp hemmen. Und zum anderen, daß Mouse Moloney Viren mit einem relativ hohen Titer generiert wurden, da die Zellen überwiegend mit beidem, einer cDNA aus der Expressionbibliothek und Miz1-Hygromycin infiziert wurden.

Ein wichtiger Aspekt für die technische Funktionalität des Screen-Verfahrens war es, die Miz1 Expression in den Zellklonen zu überprüfen, um zu beweisen, daß das induzierte Zellwachstum auf den Zugewinn einer cDNA Sequenz und nicht den Verlust der Miz1 Expression zurückzuführen ist. Es gibt Beobachtungen, daß die Zellen die Möglichkeit haben die Miz1 Expression durch Promotormethylierung, Verlust des Gens oder Veränderung der Proteinstruktur, was die Proteinmodifikationen oder die Proteinstabilität beeinflussen kann, auszuschalten.

Aufgrund dessen, wurde die Expression auf Transkriptions- und Translationsebene kontrolliert. Beide Analysen demonstrierten, daß in allen 9 Klonen weiterhin Miz1 exprimiert wird und es sich bei den identifizierten cDNAs um tatsächliche Inhibitoren der Miz1 Funktion handeln kann (siehe Abbildung 15).

PCR-Analysen der aus den Klonen präparierten genomischen DNA und der synthetisierten cDNA mit für den retroviralen Vektor spezifischen Primern und Primern spezifisch für das humane c-Myc identifizierten die cDNA-Fragmente der Klone eins bis sieben als humanes c-Myc (siehe Abbildung 10). Die Anwesenheit von humanem N-Myc wurde durch Northern-Blot Experimente mit einer für humanes N-myc spezifischen Sonde ausgeschlossen (siehe Abbildung 13). Sequenzierungen der mittels PCR-Technik isolierten cDNAs der Klone acht und neun identifizierten ein Fragment des humanen gamma Actin Gens (gi:15990563), dessen kodierende Sequenz 1127 Basenpaare umfaßt. Das isolierte Fragment war ca. 600 Nucleotide lang und in 3'-5' Richtung in den retroviralen Vektor integriert (siehe Abbildung 13). Da die isolierte cDNA keine Sequenz mit einem vollständigen Leserahmen für die Expression von gamma Actin aufwies, wurden keine weiteren Studien durchgeführt.

Zusammenfassend läßt sich über das durchgeführte Screen-Verfahren sagen, daß es technisch gut funktioniert. Es ließen sich vollständige Gensequenzen mit einer potentiellen Inhibitionsfunktion identifizieren. Jedoch führte die Ermittlung der cDNAs als humane c-Myc Sequenzen als Inhibitor des Miz1 induzierten Wachstumsarrestes nicht zu neuen Erkenntnissen, da diese Interaktion bereits bekannt und untersucht war (Peukert *et al.*, 1997). Ein Grund für die unabhängige, siebenfache Isolation von c-Myc kodierenden cDNAs könnte an der Komplexität oder Größenrepräsentation der retroviralen cDNA Expressionsbibliothek liegen. Vielleicht sind aber auch die Bedingungen des Screens zu stringent. Möglicherweise ist Myc einer der stärksten Antagonisten der Miz1 Funktion in der Zelle. Jedoch bleibt die Möglichkeit, daß weitere Miz1 inhibitorische Gene existieren, die aber nicht in der Expressionsbank present sind. Es wurde zuvor schon einmal von einem Screen berichtet, indem ebenfalls nur c-Myc oder N-Myc isoliert werden konnte (Berns *et al.*, 2000). Der Screen wurde in c-Myc defizienten Rat1-Fibroblastenzellen durchgeführt, um Gene zu identifizieren, die c-Myc in der Zellproliferation ersetzen können. Diese c-Myc defizienten Zellen wurden einmal mit retroviralen, aus humanen K562 Zellen

(Erythrozytenleukämie) stammenden Expressionsbibliothek, die auch in dieser Arbeit eingesetzt wurde und einer retroviralen aus humanen JEG3 Zellen (Choriokarzinom) stammenden Expressionsbibliothek infiziert. Die Tatsache das die K562 Genbank in zwei verschiedenen Screen-Verfahren, mehrfach unabhängige Zellklone mit c-Myc Insertionen hervorbringt deutet auf eine Überrepräsentation von c-Myc hin (Tabelle 5).

Größenfraktion der cDNA	Anzahl Klone mit selekt. Phänotyp	c-Myc cDNA	N-Myc cDNA
K562 (1-3 kb)	4	4/4	-
K562 (3-5kb)	5	3/5	-
K562 (>5)	3	3/3	-
K562 (1-3kb)	7	7/7	-
K562 (>3)	0	-	-

Tabelle 5: Zusammenfassung der genetischen Screen-Verfahren

Dargestellt sind die Ergebnisse des in dieser Arbeit beschriebenen retroviralen Screen-Verfahrens (schwarz) und des in der Arbeit von Berns et al., 2000 (grau) durchgeführten Screen-Verfahrens. Aufgelistet sind die jeweils eingesetzten Größenfraktionen, der aus humanen K562 Zellen (Erythrozytenleukemie) stammenden, retroviralen cDNA Expressionsbibliothek. Weiterhin aufgeführt ist jeweils die Gesamtzahl der selektionierten Zellklone aus den einzelnen Größenfraktionen und die Anzahl der daraus als c-Myc und N-Myc identifizierten cDNAs .

5.2 14-3-3 eta interagiert mit Miz1

Mit Hilfe einer Screening-Technik konnte in einer retroviralen cDNA-Expressionsbibliothek 14-3-3eta als Inhibitor der Funktion von Miz1 isoliert werden. 14-3-3eta hemmt sowohl das durch Miz1 induzierte langsame Wachstum von Zellen, als auch den Miz1 induzierten Zelltod.

5.2.1 Biologie der 14-3-3 Proteinfamilie

Die 14-3-3 Proteine bilden eine Familie aus sauren Polypeptiden mit einem Molekulargewicht von 29-33 kDa, die spontan Homo-oder Heterodimere mit einem Molekulargewicht von 60-70 kDa ausbilden. Der Name dieser Proteinfamilie ergab

sich 1967 durch eine systematische Klassifizierung von Gehirnproteinen, wobei die Nummern 14-3-3 auf den Fraktionsnummern nach chromatographischer Fraktionierung durch eine DEAE-Zellulose Säule und ihrer Position nach anschließender Gel Elektrophorese basieren (van Heusden, 2005). 14-3-3 Proteine werden in allen eukaryotischen Zellen, von den Hefen bis zu den Säugetieren, exprimiert und sind stark konserviert in ihrer Proteinsequenz und Funktion (Aitken, 1996). Es wurden neun homologe Isoformen (alpha (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ), epsilon (ϵ), eta (η), sigma (σ), tau (τ) und zeta (ζ)) in Säugetieren identifiziert, die durch sieben verschiedene Gene kodiert werden. Dabei stellen die Isoformen α und δ phosphorylierte Formen von β und ζ dar (Aitken et al. 1995b). In *Caenorhabditis elegans*, Hefen und in *Drosophila melanogaster* existieren dagegen nur 2 Isoformen und in Pflanzen 13. Überwiegend sind die eukaryotischen 14-3-3 Proteine im Zytoplasma lokalisiert, es gibt aber auch Studien in denen sie im Nukleus detektiert wurden (Todd et al., 1998; Novac et al., 2002). 14-3-3 Proteine sind für ihre Fähigkeit bekannt, viele zelluläre Proteinliganden zu binden. Mehr als 200 Partner wurden bis jetzt identifiziert (Tzivion et al., 2006). 14-3-3 Proteine binden Liganden mit sehr verschiedenen Funktionen wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren, Kinasen, Phosphatasen, Rezeptoren und Strukturproteine. Durch die Interaktion beeinflussen die 14-3-3 Proteine die katalytische Aktivität, die zelluläre Lokalisation, die Einbindung in Proteinkomplexe ihrer Liganden und die Zugänglichkeit für Proteasen und Phosphatasen zu den Liganden (van Heusden, 2005). Darüberhinaus haben die 14-3-3 Proteine Einfluß auf viele biologische Prozesse wie die Zellteilung, Apoptose, Transkription, den zellulären Metabolismus und die Differenzierung (Burbelo und Hall, 1995; Aitken et al., 1996; Gajewski und Thompson, 1996).

Die aus 14-3-3 Proteinen gebildeten Homo- und Heterodimere besitzen eine kelchförmige Struktur (Liu et al., 1995; Xiao et al., 1995) und binden an spezifische Phosphoserin oder Phosphothreonin enthaltene Motive ihrer Liganden (Muslin et al., 1996; Yaffe et al., 1997). Mittels einer Peptid-Bank konnten zwei verschiedene Phosphoserin (pS) Motive (Mode I und II) ermittelt werden. Diese Motive stellen optimale Bindungssequenzen für 14-3-3 Proteine dar, die von allen Isoformen gebunden werden:

Mode I : R-(S/Ar)-(+)-pS-(LEAM)-P

Mode II: R-x-(Y/F)-(+)-pS-(LEAM)-P

Die Hauptcharakteristik dieser Motive ist, daß die Phosphoaminosäure Serin (pS) von einem Arginin (R) und einem Prolin (P) flankiert ist. In beiden Motiven befindet sich an Position -1 relativ zur Phosphoaminosäure Serin eine basische Aminosäure (+) und an Position +1 relativ zur Phosphoaminosäure Serin kann ein Leucin (L), eine Glutaminsäure (E), ein Alanin (A) oder ein Methionin (M) vorkommen. Die Position -2 unterscheidet sich in ihrer Aminosäurebesetzung in den beiden Motiven. In dem Mode I Motiv findet man häufig ein Serin (S) oder eine aromatische Aminosäure (Ar). Im Mode II Motiv befindet sich an dieser Stelle vorwiegend ein Tyrosin (T) oder ein Phenylalanin (F). Der Buchstabe x im Mode II Motiv beschreibt eine beliebige Aminosäure. Zusätzlich können 14-3-3 Proteine auch an $X_3SXSX_3SX_2SX$ Sequenzen (X= unspezifische Aminosäure, S= Serin), an das Phosphothreonin (pT) enthaltende Motif (pT)YpTV und die nicht phosphorylierten Motive GHSL (Glycin-Histidin-Serin-Leucin) und WLDLE (Tryptophan-Leucin-Asparaginsäure-Leucin-Glutaminsäure; Wange *et al.* 1999) binden. Aber nicht nur die experimentell gefundenen Bindungssequenzen sind für die Interaktion verantwortlich, sondern es wird vermutet, daß es noch weitere bisher nicht identifizierte Bindungselemente gibt, welche die Interaktion der 14-3-3 Proteine mit ihren Partnern (van Heusden, 2005) unterstützen. Eine Reihe von Bindungspartnern enthalten keine Sequenzen, die präzise diese Motive enthalten. Dies kann mit der dimeren Struktur der 14-3-3 Proteine zusammenhängen. Verschiedene andere Liganden wie zum Beispiel Raf-1 und Cdc25 besitzen mehr als eine Bindungsstelle (Shen *et al.*, 2003; Tzivion *et al.*, 1998 und 2000) und die Affinität der Peptide mit zwei Bindungsmotiven für 14-3-3 Dimere ist 30fach höher als in Proteinen, die nur ein Motiv enthalten (Yaffe *et al.*, 1997). Dieses geschieht, weil nach der Bindung des ersten Phosphopeptides die Bindung des zweiten Peptides erleichtert ist. Diese kann bedeuten, daß zwei nicht konservierte Bindungsseiten ausreichen, um ein 14-3-3 Proteindimer zu binden, wenn sie nicht parallel angeordnet liegen. Das Auftreten von zwei nicht konservierten Bindungsmotiven scheint die reguläre Form der Interaktion zwischen 14-3-3 Dimer und Ligand zu sein (Yaffe *et al.*, 2002; Rittinger *et al.*, 1999). Außerdem scheint die Tatsache, daß einige Bindungspartner suboptimale Motive besitzen, eine physiologische Relevanz zu haben (Tzivion und Avruch, 2002). Ein Vorteil dieser suboptimalen Bindungsmotive könnte sein, daß sie den Liganden ermöglichen leichter von den 14-3-3 Dimeren zu dissoziieren als Liganden mit perfekten Motiven.

Die Bindung von 14-3-3 Proteinen an nicht phosphorylierte und phosphorylierte Motive erfolgt über die selbe Bindungsposition und diese können mit den Phosphopeptiden um die Bindung konkurrieren (Petosa *et al.*, 1998; Seimiya *et al.*, 2000 und Wang *et al.*, 1999). Bindungspartner mit einem nicht phosphorylierten Motiv bilden jedoch nur eine sehr kleine Gruppe, was mit vorhergehenden Studien übereinstimmt, die zeigen, daß der überwiegende Teil der 14-3-3 Interaktoren durch einen phosphorylierungsabhängigen Mechanismus gebunden wird (Meek *et al.*, 2004; Pozuelo *et al.*, 2004).

5.2.1.1 Die biologische Rolle der 14-3-3 Proteine

14-3-3 Proteine beeinflussen folgende Funktionen ihrer Interaktionspartner:

1. Sie können die Aktivität von Liganden hemmen wie zum Beispiel die von Ask-1 (Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1) oder auch aktivieren die von TPH (Tryptophan-Hydroxylase; siehe Abbildung 31c). Ein Beispiel dafür bietet die komplexe Regulation des Raf-1 Protein. Hierbei sind drei 14-3-3 Bindungsmotive beteiligt. In nicht stimulierten Zellen halten 14-3-3 Proteine Raf-1 in einer inaktiven Konformation. Nach erfolgter Stimulation wird das inhibierende 14-3-3 Protein von einer Bindungsstelle verdrängt, aber es bleibt verbunden mit einem C-terminal gelegenen Motiv, was in einer teilweisen Aktivierung von Raf-1 resultiert. Zur vollen Aktivierung bindet ein 14-3-3 Protein an zwei andere phosphorylierte Serine und stabilisiert so die aktive Konformation (siehe Abbildung 30; Tzivion *et al.*, 1998).
2. 14-3-3 Proteine können auch Protein-Protein-Interaktionen begünstigen oder inhibieren. So binden zum Beispiel Raf-1 und die Proteinkinase Bcr an ein und dasselbe 14-3-3 Dimer, woraus eine Interaktion zwischen Raf-1 und Bcr resultiert (siehe Abbildung 31e; Braselmann *et al.*, 1995). Die Interaktion zwischen Bad und Bcl-2 dagegen wird durch 14-3-3 Proteine inhibiert. Nach erfolgter Phosphorylierung von Bad durch Akt wird dieses Protein von einem 14-3-3 Dimer gebunden und damit eine Interaktion mit Bcl-2 verhindert (siehe Abbildung 31a; Datta *et al.*, 1997).
3. Eine Schlüsselrolle spielen 14-3-3 Proteine in der zellulären Lokalisation von Proteinen. Die verschiedenen Mechanismen die dieser Funktion zugrunde liegen sind noch nicht vollständig entschlüsselt. Zum Beispiel kann der Transkriptionsfaktor FKHL1 durch Phosphorylierung inaktiviert werden, was zu einer Bindung von 14-3-3 Proteinen und einer Translokation vom Nukleus in das Zytoplasma führt (siehe

Abbildung 31b; Brunet *et al.*, 1999). Ebenso wird vermutet, daß die Zellzyklus regulierende Proteinphosphatase Cdc25C, die kein eigenes nukleäres Exportsignal besitzt, durch die Bindung an 14-3-3 Proteine eines erhält (Lopez-Girona *et al.*, 1999).

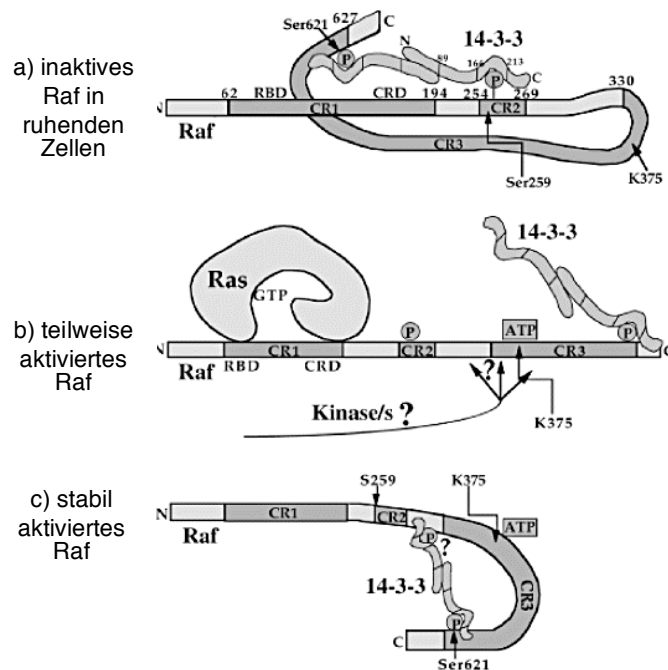


Abbildung 30: Modell für die Rolle von 14-3-3 in der Ras-abhängigen Aktivierung von cRaf

In ruhenden Zellen wird cRaf durch die Bindung eines 14-3-3 Dimers an die phosphorylierten Serine an Position 259 und 621 im inaktiven Zustand gehalten (a). Durch die GTPase Ras wird die Bindung des 14-3-3 Dimers von dem phosphorylierten Serin an Position 259 des cRaf Proteins getrennt. Dadurch können weitere Positionen des cRaf Proteins phosphoryliert werden. Beide Vorgänge führen zu einer teilweisen Aktivierung von cRaf (b). Das 14-3-3 Dimer kann nun an die neu phosphorylierten Positionen des cRaf Proteins binden, was zu einer stabilen aktivierten Konformation des cRaf Proteins führt (c).

4. Eine weitere wichtige Funktion ist, daß 14-3-3 Proteine Phosphorylierungsseiten maskieren können und somit den Liganden vor Dephosphorylierung oder sogar proteolytischem Abbau schützen (siehe Abbildung 32d; Chiang *et al.*, 2001, Dent *et al.*, 1995; Weiner und Kaiser, 1999).

Die dreidimensionale Struktur der Isoformen ζ , τ und σ wurde aufgeklärt. Die dimere Form bildet eine U-förmige Struktur, dessen Tasche groß genug ist, um zwei Peptide der Bindungspartner aufzunehmen. Jedes Monomer besteht aus neun antiparallelen α -Helices. Diese Helices bilden eine Art Wand um die negativ geladene Grube. Die Aminosäurereste die in der Innenseite der Bindungsgrube lokalisiert sind, sind stark konserviert zwischen den einzelnen Isoformen, wohingegen auf der Außenseite des

Proteins eine größere Variabilität besteht. Der N-Terminus der 14-3-3 Proteinsequenz bildet die Dimerisationsfläche und der C-Terminus formt die Seiten des Kanals.

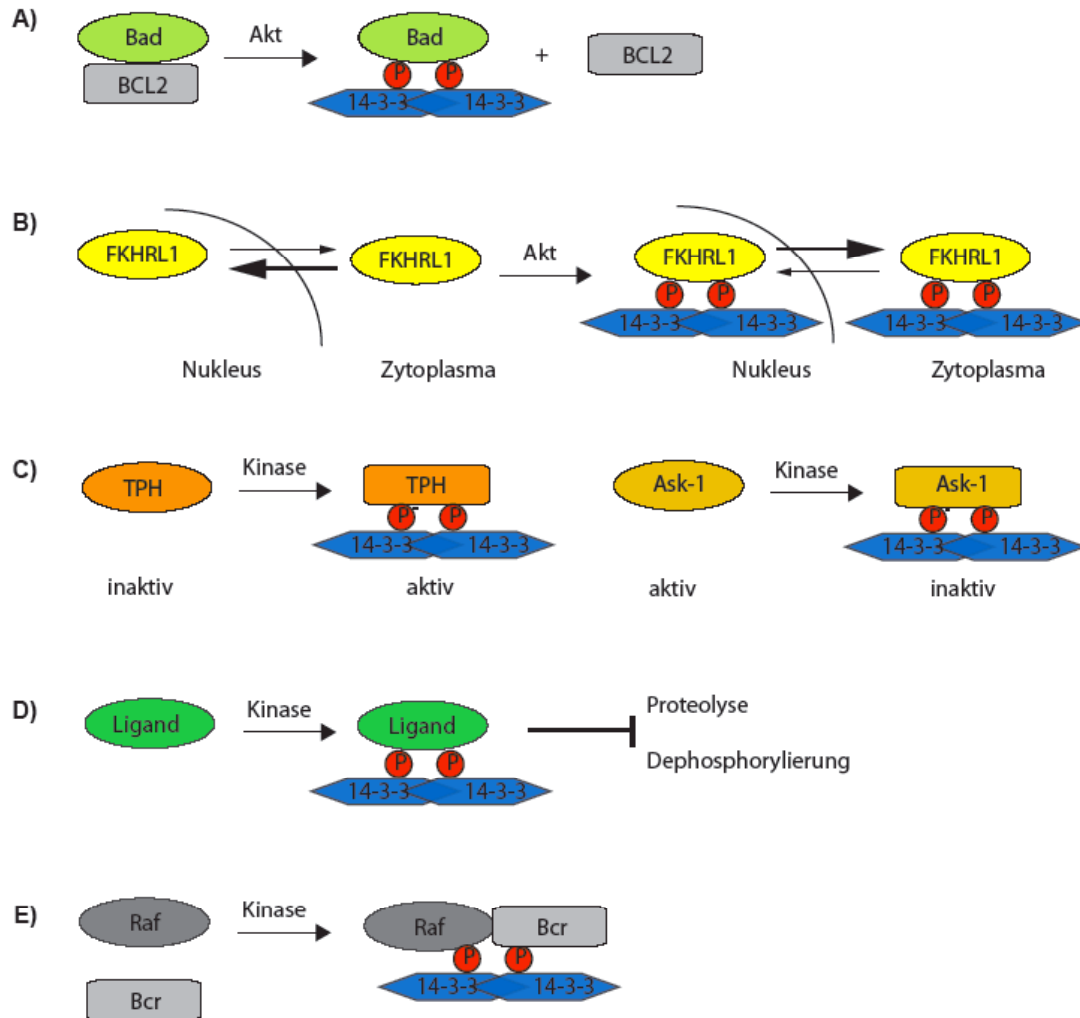


Abbildung 31: Illustrative Darstellung verschiedener 14-3-3 Regulationsmechanismen

Die Mechanismen über die 14-3-3 Proteine die Funktion ihrer Liganden regulieren, können in 5 Kategorien eingeteilt werden: A) 14-3-3 kann die Bindung des Liganden an andere Interaktionspartner beeinflussen wie bei Bad und Bcl2. B) 14-3-3 kann die zelluläre Lokalisation des Liganden ändern, wie bei FKHRL1. C) 14-3-3 kann die enzymatische Aktivität der Liganden verändern, zum einen aktivieren wie bei TPH (Tryptophan Hydroxylase) oder hemmen wie bei Ask-1. D) Bindung von 14-3-3 an den Liganden kann dessen Proteolyse oder Dephosphorylierung verhindern. E) 14-3-3 Proteine können auch als phosphorylierungsabhängige Adapter dienen, um 2 Liganden zu verbinden. Ein Beispiel ist die Interaktion von Raf mit Bcr. (nach Tzivion und Avruch, 2001)

Die Spezifität der 14-3-3 Proteine für ihre Liganden resultiert nicht aus verschiedenen Spezifitäten für das Phosphopeptid Bindemotiv, sondern wird vermutlich durch die Kontakte an der variablen Oberfläche der 14-3-3 Proteine in der Bindungsgrube

verursacht. Somit entscheiden zusätzliche strukturelle Bedingungen, ob der Ligand gebunden wird und durch welche Isoform. Weiterhin könnten einige Interaktionen auch durch gewebsspezifische Expression der verschiedenen Isoformen, wie die auf T-Zellen beschränkte Expression der τ -Isoform (Bonneyoy-Berard *et al.*, 1995) oder die auf epitheliale Zellen begrenzte Expression von 14-3-3 σ (Leffers *et al.*, 1993) reguliert werden. Andere Interaktionen könnten durch die posttranslationale Phosphorylierung von 14-3-3 Proteinen kontrolliert werden, wodurch die δ - Isoform stärker mit ihren Liganden zu interagieren scheint, als ihr nicht phosphorylierter Gegenpart ζ (Wheeler-Jones *et al.*, 1996). Dagegen scheint die Phosphorylierung von 14-3-3 Molekülen deren Fähigkeit einzuschränken an c-Raf zu binden (Rommel *et al.*, 1996).

5.2.2 Inhibierende Wirkung von 14-3-3eta auf Miz1

Das im zuvor beschriebenen genetischen Screen-Verfahren isolierte Protein 14-3-3eta zeigte in Koloniewachstumsversuchen ein zu c-Myc vergleichbares inhibitorisches Potential. Analysen von Wachstumskurven und Zellzyklusprofilen zeigen, daß 14-3-3eta einen hemmenden Einfluß auf den Miz1 induzierten G1-Arrest hat. Dieser 14-3-3eta abhängige Effekt wird durch die Inhibition der Miz1 abhängigen Transaktivierung vermittelt, worauf Reporteranalysen mit einem p21^{Cip1}, einem p15^{Ink4b} sowie einem AdML (Adenovirus major late) Promoter-Luziferasegenkonstrukt schließen lassen (siehe Abbildung 19b). 14-3-3eta weist somit die gleichen repressorischen Fähigkeiten auf die Transaktivierungsaktivität von Miz1 auf wie Myc und TopBP1 (Staller *et al.* 2001 & Herold *et al.*, 2003). Das die inhibitorische Funktion von 14-3-3eta in der Signalkaskade vermutlich der Funktion von Miz übergeordnet ist, zeigt sich in Analysen der p15^{Ink4b} und p21^{Cip1} Genexpression von Rat1 Fibroblasten, die ektopisch 14-3-3 eta und Miz1 exprimieren. Die Transkription von p15^{Ink4b} und p21^{Cip1} ist durch die ektopische Expression von 14-3-3eta deutlich reduziert, wogegen die Expression von Miz1 nicht beeinflusst ist (siehe Abbildung 19a). Weitere Reporterstudien mit anderen 14-3-3 Isoformen legen dar, daß die Hemmung der Miz1-Funktion offenbar nicht spezifisch für die eta Isoform ist (siehe Abbildung 20). Dieses ist nicht ungewöhnlich, da alle 14-3-3 Isoformen die gleichen Bindungsmotive erkennen, obwohl einige Liganden mit leicht unterschiedlicher Affinität gebunden werden im Vergleich zu anderen. Es werden zum Beispiel auch A-Raf, B-Raf, C-Raf und Bad von

allen 14-3-3 sieben Isoformen gebunden (Rittinger *et al.*, 1999). So wird auch die Deletion einer einzelnen 14-3-3 Isoform durch die anderen Isoformen kompensiert (Nguyen *et al.*, 2004). 14-3-3eta wurde in einer cDNA-Expressionsbibliothek gefunden, die aus einem menschlichen Gehirn hergestellt worden war. Datenbank-Analysen ergaben jedoch, daß 14-3-3eta nicht ausschließlich im Gehirn exprimiert wird, sondern darüber hinaus auch in zahlreichen anderen Geweben, wenn gleich dort die Expressionsrate niedriger ist. Dies deutet darauf hin, dass die Regulation der Funktion von Miz1 durch 14-3-3eta nicht gewebsspezifisch erfolgt.

Aus der Literatur ist bekannt, daß 14-3-3 Proteine als Homo-oder Heterodimere mit ihren Liganden gewöhnlich in einer phosphorylierungsabhängigen Weise über spezifische Serin oder Threonin enthaltene Motive interagieren (Yaffe *et al.*, 1997; Rittinger *et al.*, 1999). Datenbankanalysen ergaben zwei potentielle 14-3-3 Erkennungsmotive in der Miz1 Sequenz. Beide Konsensus-Motive gehören zum Mode I Typ. Die erste Sequenz liegt um die Phospho-Aminosäure Threonin an Position 291 kurz vor dem ersten Zinkfinger. Das zweite Motif liegt im fünften Zinkfinger um die Phospho-Aminosäure Serin an Position 428. Bindungsstudien zeigen, daß die endogenen 14-3-3 und Miz1 Proteine einen Komplex *in vivo* ausbilden (siehe Abbildung 21c). Mutationen der Phospho-Aminosäuren beider Bindungsmotive zu der neutral geladenen Aminosäure Alanin führten zu einem Verlust der inhibitorischen Eigenschaft von 14-3-3eta auf die Transaktivierung von Miz1 (siehe Abbildung 22b). Es wurde auch ein Austausch gegen die negativ geladene Aminosäure Aspartat durchgeführt, um eine Phosphorylierung vorzutauschen. Diese Mutante wies eine geringere Basalaktivität im Vergleich zum Wildtyp auf und war noch durch 14-3-3 inhibierbar. Der Austausch eines zweiten konservierten Serins an Position 426 im 2. Konsensusmotif zu einem Leucin führte zu einer signifikanten Reduktion der inhibitorischen Funktion von 14-3-3eta. Dieses weist daraufhin, daß die transkriptionelle Inhibition von Miz1 durch 14-3-3eta nicht allein über die Phosphoaminosäure Serin des Bindemotifs, sondern auch durch die benachbarten Aminosäuren, vermittelt wird. Diese Beobachtungen stimmen mit Daten für die Kinase Raf-1 überein (Muslin *et al.*, 1996). 14-3-3 Proteine binden Raf-1 Peptide, die zwei wichtige Serin Phosphorylierungs Motive (Serin 259 und Serin 621) des Raf-1 Proteins repräsentieren, mit hoher Affinität und in sequenzspezifischer Weise. Die Einführung von Mutationen in diese Motive zeigten, daß die Spezifität der

Erkennung auch durch benachbarte Aminosäurereste wie ein Serin an Position -2, ein Arginin an Position -3 und ein Prolin an Position +2 relativ zur Phosphoaminosäureposition bestimmt wird.

Die für die Miz1 und 14-3-3eta Interaktion ermittelten Daten lassen den Schluß zu, daß 14-3-3eta die Funktion von Miz1 durch direkte Interaktion mit beiden Mode I Erkennungsmotiven und vermutlich auch phosphorylierungsabhängig inhibiert vergleichbar zu Raf-1.

Der Mechanismus dieser Inhibition liegt nicht, wie zunächst vermutet, an einer Lokalisierungsänderung der Miz1 Proteine. Diese regulative 14-3-3 abhängige Modifizierung der zytoplasmatischen/ nukleären Verteilungen der Liganden durch Erhöhung des nukleären Exports oder Erniedrigung der nukleären Importrate ist beispielsweise für die Proteine Cdc25 (Lopez-Girona *et al.*, 1999) die Telomerase (Seimiya *et al.*, 2000) oder FKHRL1 (insulin regulated forkhead domain transcription factor 1) gut beschrieben, läßt sich aber für Miz1 in Immunfluoreszenzstudien nicht beobachten. Die mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen zeigen, daß eine Überexpression von 14-3-3eta zu keiner Änderung der zellulären Miz1 Verteilung vom Nukleus ins Zytoplasma führt (siehe Abbildung 23). Die zu beobachtende vermehrte Lokalisierung von 14-3-3eta im Nukleus ist vermutlich Konsequenz der Überexpression, weil endogene 14-3-3 Proteine überwiegend im Zytoplasma vorkommen (Todd *et al.*, 1998). Aufgrund der Beobachtung, daß die 14-3-3 Bindungsmotive direkt vor und in den Zinkfingersequenzen von Miz1 liegen, wurden DNA-Bindungsstudien ausgeführt, die demonstrierten, daß die Expression von 14-3-3eta die Bindung von Miz1 an Oligonukleotide, welche die Initiatorsequenz des p15^{Ink4b} Promoters repräsentieren, verhindert (siehe Abbildung 24a). 14-3-3eta verhinderte ebenso die Bindung der Miz S428D, aber nicht der Miz1 S428A Mutante (siehe Abbildung 24b). Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen der Reporterstudien, welche auch einen Repressionsverlust der Miz1 S428A Mutante zeigen (siehe Abbildung 22). Es scheint, daß 14-3-3eta durch Verhinderung der Bindung von Miz1 an die DNA dessen Funktion hemmt.

5.2.3 Akt und 14-3-3eta kooperieren in der Hemmung der Miz1 abhängigen Transaktivierungsaktivität

Analysen der Miz1 Sequenz nach spezifischen Kinase Erkennungsmotiven,

ergaben potentielle Akt Phosphorylierungsstellen um die Aminosäuren Threonin 291 und Serin 428. Sie zeichnen sich durch einen basischen Aminosäurerest an Position –3 relativ zur Phosphoaminosäure aus, der eine Notwendigkeit für die Phosphorylierung durch Akt darstellt. Dagegen wird eine basische Aminosäure an Position –5 in vielen, aber nicht allen Akt Substraten gefunden. Miz1 weist nur den basischen Aminosäurerest an Position –3 auf. Ein Grund für das Fehlen der basischen Aminosäure an Position –5 und somit dem Vorhandensein einer nicht sehr stringenten Akt Erkennungsstelle könnte eine regulative Phosphorylierung nur bei hoher PI3-Kinase/Akt Aktivität sein.

Reportergenstudien legten dar, daß Akt mit 14-3-3eta in der Inhibierung der Transaktivierungsaktivität von Miz1 kooperiert und daß die Mutation des Phosphoserins an Position 428 gegen ein Alanin die Inhibierung von Miz1 durch Akt verhindert. Rekombinantes Akt phosphorylierte in *in vitro* Studien nur Miz1 Peptide welche die Regionen um das Threonin 291 und das Serin 428, nicht aber das Serin 385 repräsentieren (Daten nicht gezeigt). Die Effizienz dieser Phosphorylierungen war vergleichbar zur Phosphorylierung des MDM2 Peptids, das die Phosphoaminosäure Serin 166 umgibt, eine gut charakterisierte Akt Erkennungssequenz (Mayo *et al.*, 2001 und Gottlieb *et al.*, 2002). Jedoch wurde ein GST-Miz1 Fusionsprotein durch rekombinantes Akt nur am Serin 428, nicht aber am Threonin 291 phosphoryliert. Allerdings scheint mindestens eine weitere, noch nicht identifizierte Phosphorylierungsstelle zu existieren, da die Doppelmutation S428A/T291A wie die Einzelmutation S428A zu 50% Reduktion der Phosphorylierungseffizienz führen. Die Annahme, daß das Serin 428 eine Phosphorylierungsstelle für Akt darstellt, ließ sich *in vivo* bestätigen. Die Phosphorylierung des endogenen Miz1 am Serin 428 durch den PI3-Kinase/Akt Signalweg ist von Wachstumsfaktoren abhängig, was in Studien an Zellen, denen zuerst das Serum entzogen und später wieder zugegeben wurde, zu beobachten war (siehe Abbildung 27a). Durch Zugabe des spezifischen PI3-Kinase Inhibitors LY294002 und des spezifischen Akt-Kinase 11-6-Hydroxymethyl-chiro-inositol2-[(R)-2-Omethyl-O-octadecylcarbonate vor der Serumrestimulation konnte die Phosphorylierung von Miz1 am Serin 428 verhindert werden. Versuche mit dem mTor spezifischen Inhibitor Rapamycin haben keine Veränderung der Miz1 Phosphorylierung gezeigt (siehe Abbildung 27b). Die Kinase mTor wird ebenfalls durch den PI3-Kinase/Akt Signalweg aktiviert und hätte somit auch als

Kinase für Miz1 dienen können. Diese Ergebnisse zusammen mit den Daten aus den Experimenten mit einem induzierbaren Akt-Estrogenrezeptor-Fusionsprotein (Akt-ER) und einem konstitutiv aktiven Akt Konstrukt (Myr-Akt) lassen darauf schließen, daß Miz1 am Serin 428 durch den PI3-Kinase/Akt Signalweg phosphoryliert wird (siehe Abbildung 27c und d). Die Lokalisierung von Akt wird oft als kernmembranständig beschrieben, was eine Phosphorylierung des im Kern aktiven Miz1 Proteins ausschließen würde. Adini *et al.*, (2003) beobachteten in Studien über RhoB, daß die durch Phosphorylierung aktivierte Akt Kinase vorwiegend im Nukleoplasma zu finden war. Letztendlich kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß Akt nicht die direkt phosphorylierende Kinase für Miz1 ist. Es besteht die Möglichkeit, daß eine weitere Akt-ähnliche Kinase oder eine durch den PI3-Kinase/Akt Signalweg regulierte Kinase Miz1 am Erkennungsmotif phosphoryliert.

Die PI3-Kinase/Akt abhängige Phosphorylierung des Serin 428 in Miz1 ist Voraussetzung für die Bindung von 14-3-3eta. Das beweisen die Phosphorylierungsstudien an GST-Miz1 Konstrukten mit rekombinantem Akt und anschließender Präzipitation mit einem 14-3-3eta-Flag Konstrukt, wo nur phosphoryliertes Miz1 von 14-3-3eta gebunden wird (Daten nicht gezeigt). Auch *in vivo* bilden Miz1 und 14-3-3eta nur einen Komplex, wenn der PI3-Kinase Signalweg aktiv ist. Durch Zugabe von LY294002, einem spezifischen PI3K-Inhibitor, wird die Interaktion der endogenen Proteine unterbunden (siehe Abbildung 29).

In ungestressten, proliferierenden Zellen spielt die Bindung von 14-3-3eta und die Phosphorylierung von Miz1 keine Rolle, da die Depletion von Miz1 in ungestressten Zellen keinen meßbaren Effekt auf die Genexpression zeigt (Wanzel *et al.*, 2005). Dieses stimmt mit der Beobachtung überein, daß Miz1 einen transkriptionell inaktiven Komplex mit dem durch DNA-Schädigung regulierten Protein TopBP1 ausbildet und aus diesem erst nach einem Schaden der DNA entlassen wird (Herold *et al.*, 2002). Die biologische Relevanz der Regulation von Miz1 durch den PI3-Kinase/ Akt/ 14-3-3eta Signalweg könnte in der Ermöglichung des Übergangs der Zellen von der G1- in die S-Phase nach erfolgter DNA-Schadensreparatur liegen. Die Miz1 S428A Mutante, die nicht mehr von 14-3-3eta gebunden werden kann, zeigt nach UVB-Behandlung eine signifikante Induktion des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1} die bis zu 48 Stunden stabil bleibt und nicht, wie bei Miz1 wt, nach 16 Stunden auf den Basalspiegel zurück geht. Dadurch sind die Miz1 S428A exprimierenden Zellen

nicht in der Lage aus der G1-Phase in die S-Phase und somit in den normalen Proliferationszyklus überzugehen (Wanzel *et al.*, 2005).

Die Beobachtung, daß Miz1 deletierte NIH3T3 Zellen nach erfolgter DNA Schädigung durch UVB Strahlung kein Koloniewachstum aufweisen, liegt nicht an einem Verbleiben der Zellen in der G1-Phase, sondern an einer erhöhten Apoptoserate (Wanzel *et al.*, 2005). Die DNA geschädigten Zellen können durch den Verlust von Miz1 nicht in der G1-Phase arretieren, wodurch vermutlich die in der G1-Phase induzierten DNA-Reparaturprozesse ausbleiben. Da die Zellen weiter proliferieren und Fehler in der DNA und Mutationen akkumulieren, schalten die Zellen Apoptose als Notprogramm an.

Die hier aufgeführten Ergebnisse könnten mit Untersuchungsergebnissen von hämatopoethischen Zellen korrelieren. Es wurde beschrieben, daß die Behandlung von hämatopoethischen Zellen mit wachstumsfördernden Zytokinen wie Erythropoetin oder Interleukin 3 zu einer Aktivierung der PI3-Kinase Aktivität führt. Diese erhöhte PI3-Kinase Aktivität kann nach erfolgtem DNA Schaden durch Gamma-Strahlung die Induktion eines Arrestes in der G1-Phase verhindern. Die Zellen gehen nicht in den G1-Arrest und sondern direkt weiter in die S-Phase. Aufgrund der relativ kurzen Lebensdauer dieser Zellen können Mutationen vermutlich eher toleriert werden als eine zu niedrige Zellzahl. Eine weitere Beobachtung war, daß der G1-Arrest in hämatopoethischen Zellen p53 und p21^{Cip1} unabhängig funktioniert (Eapen *et al.* 2001 und Nimbalkar *et al.*, 2003). Eventuell ist Miz1 in diesem System der Wachstumsarrest induzierende Faktor, der über den PI3-Kinase/Akt-14-3-3eta Signalweg kontrolliert wird.

5.2.4 Biologische Relevanz der 14-3-3/ Miz1 Interaktion

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Relevanz der Akt regulierten 14-3-3/ Miz1 Interaktion. Microarray Studien haben ergeben, daß Miz1 zwei verschiedene genetische Programme nach DNA-Schädigung reguliert (Wanzel *et al.*, 2005). Hierbei wurden die Genexpressionsprofile von Miz1 deletierten, von Myc und 14-3-3 überexprimierenden Ls174T Zellen vor und nach Behandlung mit Adriamycin aufgenommen und verglichen. Die Profilvergleiche (siehe Abbildung 32) zeigten, daß in Miz1 deletierten Zellen 96 Gene mehr als 1,5fach in ihrer Expression erhöht waren im Vergleich zu Wiltyp-Zellen. Nach Adriamycin Behandlung stieg in den Miz1

deletierten Zellen die Anzahl der Gene mit erhöhter Expression auf 526. Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung überein, daß Miz1 nach DNA-Schädigung aktiviert wird. Die Deletion von Miz1 führt zu einer reduzierten sowie zu einer verstärkten Genexpression. Dies läßt vermuten, daß Miz1 an der transkriptionellen Aktivierung und der Repression von Genen beteiligt ist. Weiter ergaben die Analysen, daß nach DNA Schädigung die Expression von 242 Genen sowohl durch die Überexpression von Myc als auch durch die Deletion von Miz1 erniedrigt war. Dieses deutet auf eine Miz1 abhängige Aktivierung dieser Gene, die durch Komplexierung mit Myc gehemmt wird. Nahezu keines der durch den Verlust von Miz1 aktivierten Gene wurde durch Myc reguliert. In die Gruppe der durch Miz1 aktivierten Gene gehören zum Beispiel *TBOX3* (codiert für ein Repressor Protein der ARF Expression), *DAPPER* (β -Catenin inhibitor) und dem Zellzyklusinhibitor *p21^{Cip1}*.

Ein überwiegender Teil dieser Gene ist in die DNA-Schadensantwort involviert. Nach Schädigung der DNA erhöhen 14-3-3eta und Miz1 die Expression von 82 Genen um das 1.5 fache. Alle diese Gene waren aktiviert sowohl durch den Verlust von Miz1 und als auch durch die Überexpression von 14-3-3eta. Dieses deutet auf eine die Transkription reprimierende Aktivität von Miz1, die von 14-3-3eta antagonisiert wird. In diese sehr heterogene Gruppe der durch Miz1 reprimierten Gene gehören Gene des Glukosemetabolismus (Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase, Phosphate transporter), Gene die für die Zellproliferation notwendig sind (Transkriptions- und Translationsfaktoren) und Gene, die in einer Anzahl von humanen Tumoren überexprimiert sind.

Es gab lediglich 3 Gene die gemeinsam durch 14-3-3eta, Myc und Miz1 reprimiert wurden so wie auch *p21^{Cip1}*, das nicht auf dem Arraychip repräsentiert war. Dieses läßt vermuten, daß Miz1 in zwei unterschiedliche Genexpressionswege involviert ist. Der eine Expressionsweg ist Myc abhängig und Miz1 funktioniert als transkriptioneller Aktivator. In dem anderen Expressionsweg dient Miz1 als transkriptioneller Repressor und dieser Mechanismus wird durch 14-3-3 reguliert.

Gleichzeitig wird auch deutlich, daß Miz1 in beides die Genaktivierung und die Genrepression involviert ist und beide Regulationsmechanismen unabhängig voneinander für die Miz1 induzierte Inhibition der Zellproliferation notwendig sind.

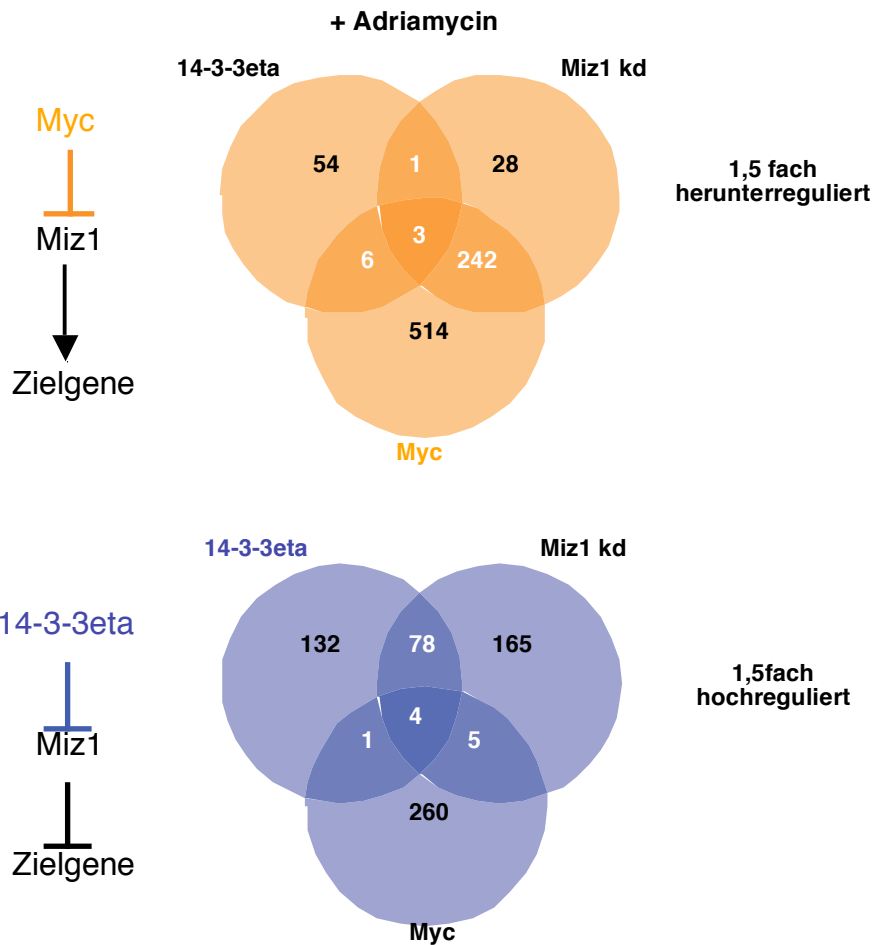


Abbildung 32: Miz1 reguliert unterschiedliche genetische Programme

Venn-diagramme zeigen die Anzahl von Genen, die in Miz1 deletierten, Myc und 14-3-3eta überexprimierenden Ls174T Zellen nach DNA-Schädigung im Vergleich zu Kontrollzellen unterschiedlich exprimiert sind. Die Arrays wurden durchgeführt mit RNA von Zellen 16h nach Behandlung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Adriamycin. Die Zahlen beschreiben die Anzahl der Gene in den unterschiedlichen Zelllinien deren Expression um den 1,5fachen Wert verändert war. Das obere Diagramm (orange) stellt die nach Schädigung der DNA reprimierten Gene dar und das untere Diagramm (blau) präsentiert die Anzahl der induzierten Gene.

Die aktivierende und reprimierende Genregulationsfunktion von Miz1 spiegelt sich im Bindungsverhalten von Miz1 an die Promotoren seiner Zielgene wieder. Chromatinimmunpräzipitationsexperimente demonstrieren, daß Miz1 an die Promotoren von beiden Myc-Miz1 und 14-3-3-Miz1 regulierten Genen *in vivo* bindet (Wanzel *et al.* 2005). Die Bindung von Miz1 and die Promotoren der beiden Genklassen ist unterschiedlich reguliert. Miz1 kann an den Promotoren von Myc-Miz1 Zielgenen wie zum Beispiel $p21^{Cip1}$ und $p57^{Kip2}$ in ungestressten Zellen detektiert werden, wenn diese Genklasse reprimiert ist. Nach Behandlung mit Adriamycin und dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 ist Miz1 auf den $p21^{Cip1}$ und $p57^{Kip2}$ Promotoren nicht nachweisbar. Diese Beobachtung stimmt mit vorherigen Ergebnissen überein,

die zeigten das die Komplexformation mit Myc die Miz1 Bindung am Promoter des *p21^{Cip1}* Gens stabilisiert und das die Myc Expression in Adriamycin behandelten Zellen abnimmt (S. Herold, persönliche Mitteilung).

Dagegen erfolgt die Bindung von Miz1 an die Promotoren von Genen, die durch 14-3-3 und Miz1 koreguliert werden, wie zum Beispiel *H41* (histocompatibility 41) und *PHT* (Phosphate transporter), erst nach Inhibition der PI3-Kinase Aktivität und nach DNA-Schädigung durch Adriamycin (Wanzel *et al.* 2005). In ungestressten Zellen konnte die Bindung von Miz1 an diese Promotoren nicht beobachtet werden. Dies stimmt mit dem Befund überein, daß 14-3-3eta die Bindung von Miz1 an die DNA verhindert (siehe Abbildung24). Warum 14-3-3eta nur die Transkription der reprimierten Gene kontrolliert und wie Miz1 beide Funktionen, die Aktivierung und Repression von Genen ausführt, könnte durch den Einsatz unterschiedlicher Zinkfinger erklärt werden. Dieser Mechanismus ist beispielsweise für den Transkriptionsfaktor CTCF (CCCTC-binding factor) beschrieben, welcher elf Zinkfinger motive besitzt. CTCF aktiviert und reprimiert die Promotoren seiner Zielgene, zu denen Tumorsuppressoren und Onkogene zählen. Untersuchungen an natürlich vorkommenden Zinkfingermutanten zeigten, daß jede Mutation eines spezifischen Zinkfingers die Bindung von CTCF an eine bestimmte Gruppe von Zielgenen aufhebt (Galina *et al.*, 2002). Dieses wurde auch für Miz1 gezeigt. Miz1 bindet mit bestimmten Zinkfingern den Promoter des Mad4 Gens und führt zu dessen Aktivierung. Interessanterweise demonstrierten Untersuchungen von verschiedenen Zinkfingerdeletionsmutanten, daß der fünfte Zinkfinger für die Aktivierung von Mad 4 nicht notwendig ist (L. Kime, Poster, Genes & Cancer Meeting 2004, Warwick, UK). Vielleicht ist dieses Zinkfinger motif, welches für die Repression durch 14-3-3eta essentiell ist, spezifisch für die repressive Funktion von Miz1. Weiterhin könnten Komplexformationen mit spezifischen Transkriptionsfaktoren die Rolle von Miz1 als Transkriptionsaktivator oder Transkriptionsrepressor bestimmen. So wie Myc und Max einen reprimierenden Komplex mit Miz1 auf Promotoren von Miz1 aktivierten Genen ausbilden, so könnte zum Beispiel ein weiteres Helix-Loop-Helix Protein HIF1 α (Hypoxia inducible factor alpha) mit Miz1 interagieren und gemeinsam mit Miz1 die Repression von Genen bewirken. Es ist bekannt, daß HIF1 α ebenfalls eine divergente Rolle im Zellzyklus spielt, da es bestimmte Gene aktiviert und andere reprimiert. Es induziert beispielsweise einen Zellzyklusarrest, indem es

der Funktion von Myc entgegen wirkt und die Repression von $p21^{Cip1}$ aufhebt. HIF1 α verdrängt Myc vom $p21^{Cip1}$ Promoter und bindet danach selbst an den Promoter. Dabei bleibt Miz1 zusammen mit Sp1 stabil am $p21^{Cip1}$ Promoter gebunden. HIF1- α reguliert ebenfalls die Expression von Myc aktivierten Genen wie *hTert* (human Telomerase reverse transcriptase) herunter (Koshiji *et al.*, 2004). Möglicherweise stellt HIF1 α einen Kofaktor für beide Miz1 Funktionen dar. Untersuchungen in Hefe-Zweihybridsystemen mit Miz1 und HIF1 α deuten auf eine mögliche Interaktion zwischen den beiden Proteinen (F. Hänel, persönliche Mitteilung).

Die Hypothese von einem aktivierenden und reprimierenden Miz1 Komplex wird durch Ergebnisse aus säulenchromatographischen Aufreinigungen unterstützt. Sie weisen darauf hin, daß Miz1 in mindestens zwei verschieden großen Komplexen vorkommt. Der eine Komplex besitzt ein Molekulargewicht von circa 1000 und der zweite von ungefähr 700 Kilodalton (J.P. Reese, persönliche Mitteilung). Welche Proteine zu diesen Komplexen gehören wird derzeit analysiert. Betrachtet man die über das Miz1 Protein erhaltenen Daten in einem Kontext, entsteht der Eindruck, daß Miz1 eventuell als Ankerprotein für andere Transkriptionsfaktoren auf den Promotoren der verschiedenen Zielgene dient und keine direkt aktivierende oder reprimierende Funktion ausübt. Darauf deuten vor allem Micro-Array Analysen, die zeigen, daß Miz1 eine Reihe von Genen mit sehr unterschiedlichen Funktionen reguliert (Wanzel *et al.*, 2005).

Insgesamt läßt sich die divergente Funktion von Miz1 in einem Model zusammenfassen (siehe Abbildung 33). Im ungestressten Zustand einer Zelle liegt Miz1 in einem inaktiven Komplex mit TopBP vor. Nach DNA-Schädigung durch beispielsweise UVB-Strahlung dissoziiert Miz1 von TopBP in Abhängigkeit der ATM/ATR Kinasen (Herold *et al.*, 2002). Folglich aktiviert das freie Miz1 nun einerseits die Transkription einer Gruppe von Zielgenen, was durch Myc/Max antagonisiert wird. Andererseits reprimiert Miz1 eine andere Gruppe von Genen und diese Funktion wird durch einen PI3-Kinase/Akt-14-3-3eta abhängigen Signalweg negativ reguliert. Dieses Model erinnert an die Regulation des durch SMAD und Forkhead Proteine vermittelten Signalweges zur Kontrolle der Zellproliferation. Die zur Familie der Forkhead Proteine gehörenden FoxO Proteine vermitteln ebenfalls, wie Miz1, einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase durch Aktivierung und Repression von Genen. Die transkriptionelle Aktivierung von $p21^{Cip1}$ wird durch das Zytokin

TGF- β induziert. Nach Stimulation bindet FoxO zusammen mit SMAD 3 und 4 an den $p21^{Cip1}$ Promoter, dabei wird durch Ablösung von Myc vom Promoter die Inhibition aufgehoben. Miz1 bleibt dagegen weiterhin gebunden. Die FoxO-SMAD Bindungsstelle, als SBR (SMAD binding region) bezeichnet, überschneidet sich nicht mit der im proximalen Promoterbereich liegenden Myc-Miz1 Bindestelle. Sie befindet sich mehr in der distalen Region des $p21^{Cip1}$ Promoters (Seoane *et al.*, 2004).

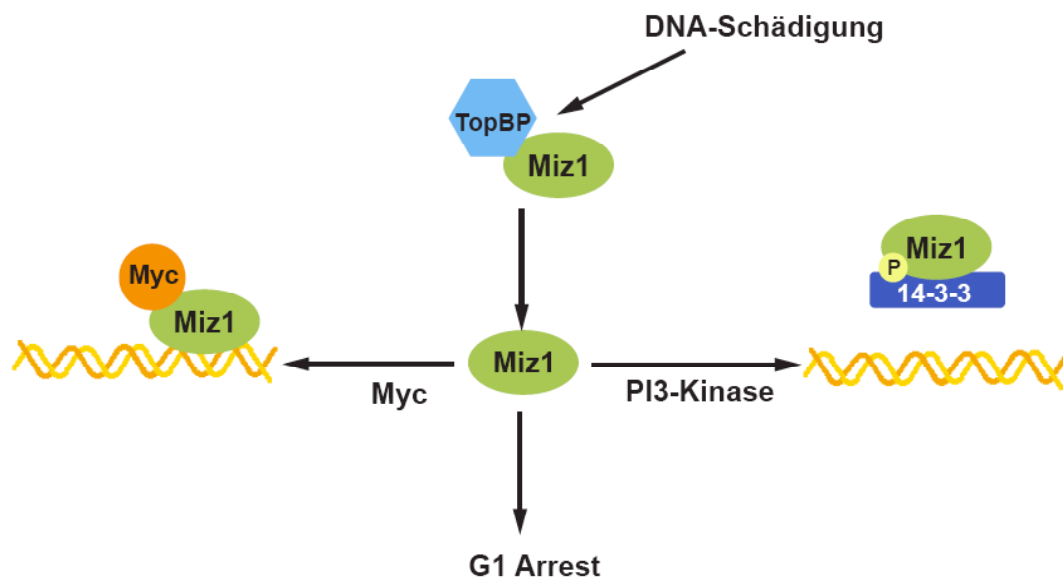


Abbildung 33: Schematisches Modell der dualen Funktion von Miz1

Das Modell zeigt die Auflösung des TopBP/Miz1 Komplexes nach DNA Schädigung. Freies Miz1 kann anschließend einerseits die Genexpression aktivieren, was durch Bindung von Myc zur Repression dieser Gene führt. Andererseits kann freies Miz1 ebenfalls die Transkription von Genen hemmen, was durch Phosphorylierung von Miz1 und Bindung an 14-3-3 antagonisiert wird.

Die durch FoxO Proteine vermittelte Genrepression betrifft eine Reihe von Myc aktivierten Genen, so zum Beispiel die Cycline D1 und D2. FoxO3a inhibiert die Genexpression durch direkte Bindung an die Promotoren und erst nach Entlassung von FoxO3a von der DNA kann Myc die Transkription aktivieren. Beide Prozesse dieser divergenten Genregulation werden durch FoxO Proteine durch einen PI3-Kinase/Akt-14-3-3 abhängigen Signalweg negativ kontrolliert (Schmidt *et al.*, 2002 und Bouchard *et al.*, 2004). Akt phosphoryliert FoxO und ermöglicht die Bindung von

14-3-3 Proteinen, welche durch Translokation der FoxO Proteine vom Nukleus ins Zytoplasma deren Inaktivität bewirken.

Die vorliegenden Daten belegen, daß Myc und 14-3-3eta einzeln ausreichend sind, den Miz1 induzierten Wachstumsarrest zu überwinden. Weiterhin zeigt sich, daß bereits eine der beiden Funktionen von Miz1, entweder die Aktivierung oder die Reprimierung bestimmter Gene, ausreichend ist, die Hemmung der Zellproliferation und die Induktion des Zellzyklusarrests in der G1-Phase auszulösen.

Um die Relevanz des Miz1 Proteins in der Genregulation besser zu verstehen, wäre es interessant den genauen Mechanismus der Miz1 abhängigen Genreprimierung zu untersuchen, da über diese Funktion, im Gegensatz zu der Genaktivierung, noch nichts bekannt ist. Zum Beispiel könnte die Identifizierung der Faktoren, die mit Miz1 einen repressiven Komplex bilden helfen, die Regulation der Promotoren der inhibierten Gene zu verstehen.

6. Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung

Der mit Myc interagierende Transkriptionsfaktor Miz1 wird für die transkriptionelle Aktivierung der Cdk-Inhibitoren p15^{Ink4b} und p21^{Cip1} benötigt. Durch die Aktivierung dieser Gene induziert Miz1 in Zellen einen Wachstumsarrest in der G1-Phase des Zellzyklus. Myc inhibiert die Miz1-abhängige Induktion des G1-Arrestes durch Ausbildung eines Komplexes mit Miz1, wodurch Myc die Transaktivierungsaktivität von Miz1 hemmt.

In der vorliegenden Arbeit wird ein retrovirales Screen-Verfahren beschrieben, daß mit dem Ziel durchgeführt wurde neue Gene zu identifizieren und charakterisieren, die für Inhibitoren der wachstumshemmenden Funktion von Miz1 kodieren. Dazu wurde eine humane cDNA-Expressionsbibliothek retroviral in Rat1-Fibroblastenzellen infiziert, die zusätzlich mit Miz1 exprimierenden Retroviren superinfiziert wurden. Der eingesetzte Titer der Miz1 exprimierenden Retroviren, führte zu einem vollständigen Wachstumsarrest in parentalen Rat1-Fibroblasten. Die Identität der cDNA-Insertionen der erhaltenen Zellklone wurde mittels PCR-Technik und Sequenzierung ermittelt. Es wurde insgesamt siebenmal eine für c-Myc kodierende cDNA und zweimal eine für ein Fragment des gamma Actin kodierende cDNA isoliert. Es konnte in allen analysierten Zellklonen eine bestehende ektopische Expression von Miz1 nachgewiesen werden. Die Isolierung vollständiger Gensequenzen mit einer Inhibitionsfunktion demonstrieren, daß das durchgeführte Screen-Verfahren technisch gut funktioniert hat. Jedoch führte die Ermittlung der cDNAs als humane c-Myc Sequenzen als Inhibitor des Miz1 induzierten Wachstumsarrestes nicht zu neuen Erkenntnissen, da diese Interaktion bereits bekannt und untersucht war (Peukert *et al.*, 1997).

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung von 14.3.3eta, als Inhibitor der Funktion von Miz1. Dabei handelt es sich um eine Isoform der 14.3.3 Proteinfamilie, die in Säugern insgesamt neun Mitglieder umfaßt. 14-3-3eta wurde als potentieller Kandidat in einem anderen retroviralen Screen-Verfahren gefunden, das ebenfalls zur Identifizierung neuer Inhibitoren der wachstumshemmenden Funktion von Miz1 durchgeführt wurde. Dazu wurde eine retrovirale cDNA-Expressionsbibliothek eingesetzt, um gezielt nach Inhibitoren zu suchen, die das langsame Wachstum von

Miz-1 überexprimierenden Rat1-Fibroblastenzellen überwinden können. Die Überexpression von 14-3-3eta hemmt den Miz1-induzierten Wachstumsarrest in der G1-Phase des Zellzyklus durch Inhibition der Miz1-abhängigen Genaktivierung der Cdk-Inhibitoren $p15^{INK4B}$ und $p21^{CIP1}$, ähnlich wie Myc und TopBP1. Darüber hinaus antagonisiert 14.3.3eta auch die Apoptose in Rat1-Fibroblasten, die durch eine Überexpression von Miz1 induziert wird. Es konnten in der Sequenz von Miz1 zwei potentielle Bindemotive für die Bindung von 14.3.3 Proteinen, sogenannte Mode I Motive, ermittelt werden, die in der Nähe und innerhalb der DNA-bindenden Domäne liegen. In dem ersten Motiv befindet sich an Position 291 ein phosphorylierbares Threonin und im zweiten Motiv an Position 428 ein phosphorylierbares Serin. 14-3-3eta bindet über diese beiden Motive direkt an Miz1. Punktmutanten von Miz1, die nicht mehr an 14-3-3eta binden können, demonstrieren, daß die Hemmung der Miz1-abhängigen Genaktivierung von $p21^{Cip1}$ und $p15^{Ink4b}$ durch 14-3-3eta von den beiden Erkennungsmotiven abhängt. Dabei ist die Hemmung von der Phosphorylierung der Aminosäuren Threonin291 und Serin428 abhängig. Mechanistisch erfolgt die Hemmung von Miz1, indem 14-3-3eta die Bindung von Miz1 an die Initiator Elemente der Zielgen-Promotoren verhindert. Die zelluläre Lokalisation von Miz1 wird durch die Interaktion mit 14-3-3eta nicht verhindert.

Die Voraussetzung der Interaktion von 14-3-3eta mit seinen Liganden ist die Phosphorylierung der Serin/ Threonin Reste in den Erkennungsmotiven. Die Phosphorylierung des Serin428 in Miz1 erfolgt durch die Akt/ PKB Kinase und ist notwendig für die Interaktion von 14-3-3eta und Miz1 und die daraus resultierende Inhibition der Funktion von Miz1.

Genexpressionsanalysen zeigten, daß Miz1 zwei verschiedene Funktionen in der Regulation der Genexpression besitzt. Zum einen ist Miz1 für die nach DNA-Schädigung erfolgende Aktivierung einer großen Gruppe von Genen notwendig. Diese Funktion wird durch Myc, aber nicht durch Akt/ 14-3-3eta reguliert. Zum anderen reprimiert Miz1 eine Gruppe von Genen nach Schädigung der DNA. Diese reprimierende Funktion wird durch Akt/ 14-3-3eta aber nicht durch Myc reguliert. Die Akt-abhängige Phosphorylierung von Miz1 und die darauf folgende Bindung von 14-3-3eta scheint in der Regulation des Zellzyklusarrestes während der DNA-Schadensantwort eine wichtige Rolle zu spielen.

6.2 English summary

The Myc interacting transcription factor Miz1 is required for the transcriptional activation of the cyclin dependent kinase inhibitors p15^{Ink4b} and p21^{Cip1}. It is through the activation of these genes that Miz1 induces a cell cycle arrest in the G1-phase of cells. Myc prevents the Miz1 dependent induction of the G1-arrest by forming a complex with Miz1 and thereby repressing the transcriptional activity of Miz1.

In the presented dissertation, a retroviral screen was performed, in an attempt to both identify and subsequently characterize novel genes encoding inhibitors of the growth suppressive function of Miz1. To this end, a human cDNA library was retrovirally infected into Rat1 fibroblasts that had been additionally superinfected with Miz1 expressing retroviruses. The titer of the Miz1 expressing retroviruses caused a complete growth arrest in parental Rat1 fibroblasts. To determine the identity of the inserted cDNAs of the isolated clones, both PCR and sequencing procedures were performed. Altogether, a cDNA encoding human c-Myc was isolated seven times whilst a cDNA encoding a fragment of the human gamma actin1 was isolated twice. In all of the analysed cell clones ectopic Miz1 expression was detectable. The isolation of entire gene sequences with an inhibitory function demonstrated that the executed screening assay was technically working. However the identification of the hit cDNAs inhibiting the Miz1 induced growth arrest as being human c-Myc sequences did not precede new findings because of the already known and well studied interaction of c-Myc and Miz1 (Peukert *et al.*, 1997).

The second part of the dissertation deals with the characterization of 14-3-3eta as an inhibitor of the function of Miz1. 14-3-3eta is an isoform of the 14-3-3 protein family which contains nine family members in mammals. 14-3-3eta was found as a potential candidate in a separate retroviral screen that was also performed to identify new inhibitors of the growth suppressive properties of Miz1. In this instance, a retroviral cDNA expression library was used to find systematically inhibitors that could overcome the slow growth phenotype of Miz1 expressing Rat1 fibroblasts. Overexpression of 14-3-3eta overcame Miz1 induced growth arrest in the G1 phase of the cell cycle and inhibited transcriptional activation of the Cdk inhibitors p15^{Ink4b} and p21^{Cip1} by Miz1 similar to c-Myc and TopBP1. Furthermore 14-3-3eta overexpression antagonizes the

Miz1 induced apoptosis in Rat1 fibroblasts. Sequence analysis of the Miz1 sequence revealed two potential binding motifs for 14-3-3 proteins. They are located close to and within the DNA binding domain of Miz1. In the first motif lies a phosphorylatable threonine at position 291 and in the second motif lies a phosphorylatable serine at position 428. 14-3-3eta binds directly to Miz1 through these two consensus binding sites. It was shown using point mutants of Miz1 which are deficient in 14-3-3eta binding show that binding of 14-3-3eta to this consensus sites is necessary to block Miz1 mediated transcriptional activation of p21^{Cip1} and p15^{Ink4b}. Furthermore, phosphorylation of the serine/ threonine residues in these recognition motifs is prerequisite for the interaction of 14-3-3 to Miz1. The inhibition of Miz1 by 14-3-3eta mechanistically functions by preventing the binding of Miz1 to the initiator elements of the target gene promoters. The interaction with 14-3-3eta had no effect on the subcellular localization of Miz1.

An assumption for the interaction of 14-3-3 with its ligands is the phosphorylation of the serine/ threonine residues in the binding motifs. The phosphorylation of the serine at position 428 in the second binding motif is carried out by the Akt/ PKB kinase and is essential for the interaction of 14-3-3eta and Miz1 and the subsequent inhibition of the Miz1 function.

Gene expression analysis demonstrated that Miz1 has two distinct functions in regulation of gene expression. Firstly, Miz1 is required for DNA damage induced upregulation of a large group of genes. This function is regulated by Myc but not by Akt/ 14-3-3eta. Secondly, Miz1 represses the expression of a large group of genes in response to DNA damage in an Akt/ 14-3-3eta, but not a Myc regulated manner. Akt dependent phosphorylation of Miz1 and the following binding of 14-3-3eta may thus regulate growth arrest in response to DNA damage.

- Adams, J.M., Harris, A.W., Pinkert, C.A., Corcoran, L.M., Alexander, W.S., Cory, S., Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. (1985) The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature*. 12-18;318(6046):533-8
- Adhikary, S., Peukert, K., Karsunky, H., Beuger, V., Lutz, W., Elsässer, H. P., Moroy, T., and Eilers, M. (2003). Miz1 is required for early embryonic development during gastrulation. *Mol Cell Biol* 23, 7648-7657.
- Adini, I., Rabinovitz, I., Sun, J.F., Prendergast, G.C., and Benjamin, L.E. (2003). RhoB controls Akt trafficking and stage-specific survival of endothelial cells during vascular development. *Genes Dev* 17(21):2721-32.
- Ahmad, K.F., Engel, C.K. and Privé, G.G. (1998). Crystal structure of the BTB domain from PLZF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(21):12123-8.
- Aitken, A., Howell, S., Jones, D., Madrazo, J., Martin, H., Patel, Y. and Robinson, K. (1995a). Post-translationally modified 14-3-3 isoforms and inhibition of protein kinase C. *Mol. Cell. Biochem.* 149, 41-49.
- Aitken, A., Howell, S., Jones, D., Madrazo, J. and Patel, Y. (1995b). 14-3-3 σ and δ are the phosphorylated forms of Raf-activating 14-3-3 β and ζ . *J. Biol. Chem.* 270, 5706-5709.
- Aitken, A. (1996). 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signaling pathways. *Trends Cell Biol.* 6, 341-347.
- Alexandrow, M.G., Kawabata, M., Aakre, M. and Moses, H.L. (1995). Overexpression of the c-Myc oncoprotein blocks the growth-inhibitory response but is required for the mitogenic effects of transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(8):3239-43.
- Bader, S.A., Fasching, C., Brodeur, G.M. and Stanbridge, E.J. (1991). Dissociation of suppression of tumorigenicity and differentiation in vitro effected by transfer of single human chromosomes into human neuroblastoma cells. *Cell Growth Differ.* 2(5):245-55.
- Bardwell, V. J., and Treisman, R. (1994). The POZ domain: A conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev* 8, 1664-1677.
- Barrett, M.T., Schutte, M., Kern, S.E. and Reid, B.J. (1996). Allelic loss and mutational analysis of the DPC4 gene in esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res.* 56(19):4351-3.
- Benetti, R., Del Sal, G., Monte, M., Paroni, G., Brancolini, C. and Schneider, C. (2001). The death substrate Gas2 binds m-calpain and increases susceptibility to p53-dependent apoptosis. *EMBO J.* 20(11):2702-14
- Berns, K., Hijmans, E.M., Koh, E., Daley, G.Q. and Bernards, R. (2000). A genetic screen to identify genes that rescue the slow growth phenotype of c-myc null fibroblasts. *Oncogene* 6;19(29):3330-3334.
- Bonnefoy-Berard, N., Liu, Y.C., von Willebrand, M., Sung, A., Elly, C., Mustelin, T., Yoshida, H., Ishizaka, K. and Altman, A. (1995). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity by association with 14-3-3 proteins in T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(22):10142-6.
- Bos, J. L. (1989): Ras oncogenes in human cancer: a review, *Cancer Research* 49, 4682-4689.
- Bouchard, C., Marquardt, J., Bras, A., Medema, H. and Eilers, M. (2004). Myc-induced proliferation and transformation require Akt-mediated phosphorylation of FoxO proteins. *EMBO J.* 21;23(14):2830-40.

- Boveri, T. (1914) Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Verlag von Gustav Fischer, Jena
- Bowen, H., Biggs, T.E., Phillips, E., Baker, S.T., Perry, V.H., Mann, D.A. and Barton, C.H. (2002). C-Myc represses and Miz-1 activates the murine natural resistance-associated protein 1 promoter. *J Biol Chem* 277(38):34997-5006.
- Brasemann, S. and McCormick, F. (1995). Bcr and Raf form a complex in vivo via 14-3-3 proteins. *EMBO J.* 2;14(19):4839-48
- Brenner, C., Deplus, R., Didelot, C., Loriot, A., Viré, E., De Smet, C., Gutierrez, A., Danovi, D., Bernard, D., Boon, T., Pelicci, P.G., Amati, B., Kouzarides, T., de Launoit, Y., Di Croce, L. and Fuks, F. (2005). Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J.* 26;24(2):336-46.
- Brodeur, G. M., Sekhon, G., and Goldstein, M.N. (1977). Chromosomal aberrations in human neuroblastomas. *Cancer* 40, 2256-2263.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P. Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868
- Burbelo, P.D. and Hall, A. (1995). 14-3-3 proteins. Hot numbers in signal transduction. *Curr Biol.* 1;5(2):95-6.
- Caron, H., van Sluis, P., van Hove, M., de Kraker, J., Bras, J., Slater, R., Mannens, M., Voûte, P.A., Westerveld, A. and Versteeg, R.. (1993). Allelic loss of chromosome 1p36 in neuroblastoma is of preferential maternal origin and correlates with N-myc amplification. *Nat Genet.* 4(2):187-90.
- Chang Y.C., Illenye S. and Heintz N.H. (2001). Cooperation of E2F-p130 and Sp1-pRb complexes in repression of the Chinese hamster dhfr gene. *Mol Cell Biol.* 21(4):1121-31.
- Chen, J.P., Kang, Y. and Massague, J. (2001). Inaugural article: defective repression of c-myc in breast cancer cells: a loss at the core of the TGF- β growth arrest program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 992-999.
- Chiang, C.W., Harris, G., Ellig, C., Masters, S.C., Subramanian, R., Shenolikar, S., Wadzinski, B.E. and Yang, E. (2001). Protein phosphatase 2A activates the proapoptotic function of BAD in interleukin-3-dependent lymphoid cells by a mechanism requiring 14-3-3 dissociation. *Blood* 1;97(5):1289-97
- Claaßen, G.F. and Hann, S.R. (2000). A role for transcriptional repression of p21^{CIP1} by c-Myc in overcoming transforming growth factor β -induced cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;97(17):9498-503.
- Coffey, R. J. J., Bascom, C. C., Sipes, N. J., Graves-Deal, R., Weissman, B. E., and Moses, H. L. (1988). Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor β . *Mol Cell Biol* 8, 3088.
- Comings, D.E. (1973). A general theory of carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(12):3324-8.
- Coppola, J.A. and Cole, M.D. (1986). *Nature*, 320, 760-763. Constitutive c-myc oncogene expression blocks mouse erythroleukaemia cell differentiation but not commitment.
- Corden, J., Wasylyk, B., Buchwalder, A., Sassone-Corsi, P., Kedinger, C. and Chambon, P. (1980). Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes. *Science*. 19;209(4463):1406-14.

- Craparo, A., Freund, R. and Gustafson, T. A., J., (1997). 14-3-3 (epsilon) interacts with the insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor substrate I in a phosphoserine-dependent manner. *Biol. Chem*, 272, 11663-11669
- Cultraro, C.M., Bino, T., Segal, S. (1997) Regulated expression and function of the c-Myc antagonist, Mad1, during a molecular switch from proliferation to differentiation. *Curr Top Microbiol Immunol*. 224:149-58
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- Datto, M.B., L., Y., Panus, J.F., Howe, D.J, Xiong, Y. and Wang, X.F. (1995) Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6;92(12):5545-9.
- Dauphinot, L., De Oliveira, C., Melot, T., Sevenet, N., Thomas, V., Weissman, B.E. and Delattre, O. (2001). Analysis of the expression of cell cycle regulators in Ewing cell lines: EWS-FLI-1 modulates p57KIP2 and c-Myc expression. *Oncogene* 31;20(25):3258-65.
- Deng, C., P. Zhang, J. W. Harper, S. J. Elledge, and P. Leder. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82:675-684.
- Dent, P., Reardon, D.B., Morrison, D.K., Sturgill, T.W. (1995). Regulation of Raf-1 and Raf-1 mutants by Ras-dependent and Ras-independent mechanisms in vitro. *Mol Cell Biol*. 15(8):4125-35
- Derynck, R., Zhang, Y. and Feng, X.H. (1998). Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 11;95(6):737-40.
- Deweindt, C., Albagli, O., Bernardin, F., Dhordain, P., Quief, S., Lantoine, D., Kerckaert, J. P., and Leprince, D. (1995). The LAZ3/BCL6 oncogene encodes a sequence-specific transcriptional inhibitor: a novel function for the BTB/POZ domain as an autonomous repressing domain. *Cell Growth Differ* 6, 1495-1503.
- Dhordain, P., Albagli, O., Ansieau, S., Koken, M.H., Deweindt, C., Quief, S., Lantoine, D., Leutz, A., Kerckaert, J.P. and Leprince, D.. (1995). The BTB/POZ domain targets the LAZ3/BCL6 oncoprotein to nuclear dots and mediates homomerisation in vivo. *Oncogene* 21;11(12):2689-97.
- Dickinson, M.E., Kobrin, M.S., Silan, C.M., Kingsley, D.M., Justice, M.J., Miller, D.A., Ceci, J.D., Lock, L.F., Lee, A. and Buchberg, A.M. (1990). Chromosomal localization of seven members of the murine TGF-beta superfamily suggests close linkage to several morphogenetic mutant loci. *Genomics* 6(3):505-20.
- Eapen, A.K., Henry, M.K., Quelle, D.E. and Quelle, F.W. (2001). Dna damage-induced G(1) arrest in hematopoietic cells is overridden following phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of cyclin-dependent kinase 2. *Mol Cell Biol*. 21(18):6113-21
- Eckert, W. A. and Kartenbeck, J. (1996) *Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie. Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion.* Springer Verlag, Labormanual.
- Ehrig, K., Leivo, I., Argraves, W. S., Ruoslahti, E. and Engvall, E. (1990). Merosin, a tissue-specific basement membrane protein, is a laminin-like protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 87: 3264-3268,
- Eisenman, R.N. (2001). Deconstructing myc. *Genes Dev*. 15;15(16):2023-30
- El-Deiry, W. S., J. W. Harper, P. M. O'Connor, V. E. Velculescu, C. E. Canman, J. Jackman, J. A. Pietsenpol, M. Burrell, D. E. Hill, Y. Wang, K. G. Wiman, W. E. Mercer, M. B. Kastan, K. W. Kohn, S. J. Elledge, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein. (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and

apoptosis. *Cancer Res.* 54:1169-1174

Erikson, J., Finger, L., Sun, L., ar-Rushdi, A., Nishikura, K., Minowada, J., Finan, J., Emanuel, B.S., Nowell, P.C. and Croce, C.M. (1986). Deregulation of c-myc by translocation of the alpha-locus of the T-cell receptor in T-cell leukemias. *Science* 16;232(4752):884-6.

Filippova, G.N., Fagerlie, S., Klenova, E.M., Myers, C., Dehner, Y., Goodwin, G., Neiman, P.E., Collins, S.J., and Lobanekov, V.V. (1996). An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol Cell Biol.* 16(6):2802-13.

Filippova GN, Qi CF, Ulmer JE, Moore JM, Ward MD, Hu YJ, Loukinov DI, Pugacheva EM, Klenova EM, Grundy PE, Feinberg AP, Cleton-Jansen AM, Moerland EW, Cornelisse CJ, Suzuki H, Komiya A, Lindblom A, Dorion-Bonnet F, Neiman PE, Morse HC 3rd, Collins SJ, Lobanekov VV., (2002) Tumor-associated zinc finger mutations in the CTCF transcription factor selectively alter its DNA-binding specificity. *Cancer Res.* 1;62(1):48-52.

Flørenes, V.A., Bhattacharya, N., Bani, M.R., Ben-David, Y., Kerbel, R.S. and Slingerland, J.M. (1996). TGF-beta mediated G1 arrest in a human melanoma cell line lacking p15INK4B: evidence for cooperation between p21Cip1/WAF1 and p27Kip1. *Oncogene* 5;13(11):2447-57.

Foley, K.P., McArthur, G.A., Queva, C., Hurlin, P.J., Soriano, P. and Eisenman, R.N. (1998). Targeted disruption of the MYC antagonist MAD1 inhibits cell cycle exit during granulocyte differentiation. *EMBO J.* 2;17(3):774-85.

Fong, C. T., Dracopoli, N. C., White, P. S., Merrill, P. T., Griffith, R. C., Housman, D. E., and Brodeur, G. M. (1989). Loss of heterozygosity for the short arm of chromosome 1 in human neuroblastomas: correlation with N-myc amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 3753-3757.

Franks, L.M., and Teich, M.N. (1997). Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. Oxford Medical publication.

Furlanetto, R. W., Dey, B. R., Lopaczynski, W. and Nissley, S. P., (1997). 14-3-3 proteins interact with the insulin-like growth factor receptor but not the insulin receptor. *Biochem J.* ,327, 765-771

Gajewski, T.F. and Thompson, C.B. (1996). Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence. *Cell.* 15;87(4):589-92.

Gandarillas, A., Davies, D. and Blanchard ,J.M. (2000). Normal and c-Myc-promoted human keratinocyte differentiation both occur via a novel cell cycle involving cellular growth and endoreplication. *Oncogene* 6;19(29):3278-89

Gartel, A. L., Ye, X., Goufman, E., Shianov, P., Hay, N., Najmabadi, F., and Tyner, A. L. (2001). Myc represses the p21(WAF1/CIP1) promoter and interacts with Sp1/Sp3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4510-4515.

Gebhardt, A., Freye, M., Herold, S., Benitah, S.A., Braun, K., Samans, B., Watt, F.M., Elsässer, H.P. and Eilers, M. (2006). Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1. *JCB* 172, 2; (1): 139-149

Gottlieb, T.M., Leal, J.F., Seger, R., Taya, Y. and Oren, M. (2002). Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene.* 14;21(8):1299-303.

Greer, D.A., Besley, B.D.A., Kennedy, K.B., Davey, S. (2003): hRad9 rapidly binds DNA containing double-strand breaks and is required for damage-dependent topoisomerase II binding protein 1 focus formation. *Cancer Res* 63: 4829-4835.

Grignani, F., Kinsella, T., Mencarelli, A., Valtieri, M., Riganelli, D., Lanfrancone, L., Peschle, C., Nolan, G. P., and Pelicci, P. G. (1998). High-efficiency gene transfer and selection of human hematopoietic progenitor cells with a hybrid EBV/retroviral vector expressing the green fluorescence protein. *Cancer Res* 58, 14-19.

Gu, J., Dubner, R., Fornace, A.J., Iadarola, M.J. (1995). UREB1, a tyrosine phosphorylated nuclear protein, inhibits p53 transactivation. *Oncogene* 16;11(10):2175-8

Haluska, F., G., Tsujimoto, Y. and Croce, C.M. (1988). The t(8;14) breakpoint of the EW 36 undifferentiated lymphoma cell line lies 5' of Myc in a region prone to involvement in endemic Burkitt's lymphomas. *Nucleic Acids Research* 16(5PtB):2077-2085.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*. 7;100(1):57-70.

Hannon, G. J., and Beach, D. (1994). p15^{INK4b} is a potential effector of cell cycle arrest mediated by TGF- β . *Nature* 371, 257-261.

Harlow, E., and Lane, D. (1988). *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory).

Harrington, E.A., Bruce, J.W., Harlow, E. and Dyson, N. (1998). pRb plays an essential role in cell cycle arrest induced by DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 11945-11950

He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-1512.

Herold, S., Wanzel, M., Beuger, V., Frohme, C., Beul, D., Hillukkala, T., Syvaaja, J., Saluz, H. P., Hänel, F., and Eilers, M. (2002). Negative Regulation of the Mammalian UV Response by Myc through Association with Miz-1. *Mol Cell* 10, 509-521.

Honda, Y., Tojo, M., Matsuzaki, K., Anan, T., Matsumoto, M., Ando, M., Saya, H., Nakao, M. (2002): Cooperation of HECT-domain ubiquitin ligase hHYD and DNA topoisomerase II-binding protein for DNA damage response. *J Biol Chem* 277:3599-3605

Huang, S.M., Schonthal, A.H. and Stallcup, M.R. (2001). Enhancement of p53-dependent gene activation by the transcriptional coactivator Zac1. *Oncogene* 19;20(17):2134-43.

Hurlin, P.J., Queva, C., Koskinen, P.J., Steingrimsson, E., Ayer, D.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. and Eisenman, R.N. (1996). Mad3 and Mad4: novel Max-interacting transcriptional repressors that suppress c-myc dependent transformation and are expressed during neural and epidermal differentiation. *EMBO J*. 15;15(8):2030.

Iavarone, A. und Massague, J. (1997). Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature* 22;387(6631):417-22.

Ikegaki, N., Gotoh, T., Kung, B., Riceberg, J.S., Kim, D.Y., Zhao, H., Rappaport, E.F., Hicks, S.L., Seeger, R.C. and Tang, X.X. (2007). De novo identification of MIZ-1 (ZBTB17) encoding a MYC-interacting zinc-finger protein as a new favorable neuroblastoma gene. *Clin Cancer Res* 15; 13(20) 6001-9

Ishii H. and Majerus PW. (1985). Thrombomodulin is present in human plasma and urine. *J. Clin Invest*. Dec;76(6):2178-81.

James, L. and Eisenman, R.N. (2002). Myc and Mad bHLHZ domains possess identical DNA-binding specificities but only partially overlapping functions *in vivo*. *PNAS* 99: 10429-10434;

Jurvansuu, J., Raj, K., Stasiak, A., Beard, P. (2005): Viral transport of DNA damage that mimics a stalled replication fork. *J Virol* 79: 569-580.

- Kaplan, J., and Calame, K. (1997). The ZiN/POZ domain of ZF5 is required for both transcriptional activation and repression. *Nucleic Acids Res* 25, 1108-1116.
- Kime, L., and Wright, S. C. (2003). Mad4 is regulated by a transcriptional repressor complex that contains Miz-1 and c-Myc. *Biochem J* 370, 291-298.
- Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1998). Landscaping the cancer terrain. *Science* 15;280(5366):1036-7.
- Knudson, A.G. Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 68(4):820-3.
- Koh, E.Y., Chen, T. and Daley, G.Q. (2002). Novel retroviral vectors to facilitate expression screens in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 15;30(24) 42
- Koh, E.Y., Chen, T. and Daley, G.Q. (2004). Genetic complementation of cytokine signaling identifies central role of kinases in hematopoietic cell proliferation. *Oncogene* 23, 1214–1220.
- Koonin, E.V., Altschul, S.F. and Bork, P. (1996). BRCA1 protein products ... Functional motifs... *Nat Genet.* 13(3):266-8
- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P. J., and Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 19, 379-383.
- Koshiji, M., Kageyama, Y., Pete, E.A., Horikawa, I., Barrett, J.C. and Huang, L.E. (2004). HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J.* 5;23(9):1949-56.
- Kwabi-Addo, B., Giri, D., Schmidt, K., Podsypanina, K., Parsons, R., Greenberg N. and Ittmann, M. (2001). Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 25;98(20):11563-8.
- Laemmli, U. K., Beguin, F., and Gujer-Kellenberger, G. (1970). A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* 47, 69-85.
- Leffers, H., Madsen, P., Rasmussen, H.H., Honor, e B., Andersen, A.H., Walbum, E., Vandekerckhove, J. and Celis, J.E. (1993). Molecular cloning and expression of the transformation sensitive epithelial marker stratifin. A member of a protein family that has been involved in the protein kinase C signalling pathway. *J Mol Biol.* 20;231(4):982-98.
- Li, L., Nerlov, C., Prendergast, G., MacGregor, D., and Ziff, E. B. (1994). c-Myc represses transcription *in vivo* by a novel mechanism dependent on the initiator element and Myc box II. *EMBO J* 13, 4070-4079.
- Liu, D., Bienkowska, J., Petosa, C., Collier, R.J., Fu, H. and Liddington, R. (1995). *Nature* 376, 191-194. Crystal structure of the ζ isoform of the 14-3-3 protein.
- Liu, M., Iavarone, A., and Freedman, L. P. (1996). Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation. *J Biol Chem* 271, 31723-31728.
- Liu, K., Paik, J.C., Wang, B., Lin, F.T. and Lin, W.C. (2006). Regulation of TopBP1 oligomerization by Akt/PKB for cell survival. *EMBO* 25, 4795–4807,
- Liu, Y.C., Liu, Y., Elly, C., Yoshida, H., Lipkowitz, S. and Altman, A. (1997). Serine phosphorylation of Cbl induced by phorbol ester enhances its association with 14-3-3 proteins in T cells via a novel serine-rich 14-3-3-binding motif. *J Biol Chem.* 11;272(15):9979-85.

- Lopez-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O. and Russell, P. (1999). Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature*. Jan 14;397(6715):172-5.
- Magal, S. S., Jackman, A., Pei, X. F., Schlegel, R., and Sherman, L. (1998). Induction of apoptosis in human keratinocytes containing mutated p53 alleles and its inhibition by both the E6 and E7 oncoproteins. *Int J Cancer* 75, 96-104.
- Mäkinen, M., Hillukkala, T., Tuusa, J., Reini, K., Vaara, M., Huang, D., Pospiech, H., Majuri, I., Westerling, T., Makela, T. P., and Syvaöja, J. E. (2001). BRCT domain-containing protein TopBP1 functions in DNA replication and damage response. *J Biol Chem* 276, 30399-30406
- Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M. L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W. F., Moyer, M. P., Riecken, E. O., Buhr, H. J., and Hanski, C. (1999). Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1603-1608.
- Mann, R., Mulligan, R. C. and Baltimore, D. (1983). Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell*. 33 (1):153-9
- Massague, J. and Chen, Y.G. (2000a). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 15;14(6):627-44.
- Massague, J. and Wotton, D. (2000b). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 17;19(8):1745-54.
- Massague, J., Blain, S.W. and Lo, R.S. (2000c). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*.13;103(2):295-309.
- Masters, S.C., Pederson, K.J., Zhang, L., Barbieri, J.T. and Fu, H., (1999). Interaction of 14-3-3 with a nonphosphorylated protein ligand, exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 38, 5216-5221
- Mayo, L.D. and Donner, D.B. (2001). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 25;98(20):11598-603
- Miller, S. G., De Vos, P., Guerre-Millo, M., Wong, K., Hermann, T., Staels, B., Briggs, M. R. and Auwerx, (1996) The adipocyte specific transcription factor C/EBP-alpha modulates human ob gene expression. *J. Proc. Nat. Acad. Sci.* 93: 5507-5511
- Mils, V., Baldin V., Goubin, F., Pinta, I., Papin, C., Waye, M., Eychene, A. and Ducommun, B., (2000). Specific interaction between 14-3-3 isoforms and the human CDC25B phosphatase. *Oncogene* 19, 1257-1265
- Montesano R.M., Hollstein, M. und Hainaut, P. (1996). Genetic alterations in esophageal cancer and their relevance to etiology and pathogenesis. *Review. Int. J. cancer (Pred Oncol.)* 69:225-235.
- Moorhead, G., Douglas, P., Morrice, N., Scarabel, M., Aitken, A. and MacKintosh, C. (1996). Phosphorylated nitrate reductase from spinach leaves is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicoccin. *Curr Biol*. Sep 1;6(9):1104-13.
- Morgenstern, J. P., and Land, H. (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* 18, 3587-3596.
- Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M. and Shaw, A. S., (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, 84, 889-897

- Nimbalkar, D., Henry, M.K. and Quelle, F.W. (2003). Cytokine activation of phosphoinositide 3-kinase sensitizes hematopoietic cells to cisplatin-induced death. *Cancer Res.* 1;63(5):1034-9
- Novac, O., Alvarez, D., Pearson, C.E., Price, G.B. and Zannis-Hadjopoulos, M. (2002). The human cruciform-binding protein, CBP, is involved in DNA replication and associates in vivo with mammalian replication origins. *J Biol Chem.* 29;277(13):11174-83.
- Nowell P.C. and Hungerford, D.A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* 25:85-109.
- Oberg, F., Larsson, L. G., Anton, R., and Nilsson, K. (1991). Interferon gamma abrogates the differentiation block in v-myc-expressing U-937 monoblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5567-5571.
- Oliner, J.D., Kinzler, K.W., Meltzer, P.S., George, D.L. and Vogelstein, B. (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature.* 2;358(6381):80-3
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8392-8396.
- Peng, C.Y., Graves, P.R., Thoma, R.S., Wu, Z., Shaw, A.S. and Piwnicka-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* 5;277(5331):1501-5.
- Perera, D., Perez-Hidalgo, L., Moens, P.B., Reini, K., Lakin, N., Syväoja, J.E., San-Segundo, P.A., Freire, R. (2004): TopBP1 and ATR colocalization at meiotic chromosomes: role for TopBP1/Cut5 in the meiotic recombination checkpoint. *Mol Biol Cell* 15: 1568-1579.
- Petosa, C., Masters, S.C., Bankston, L.A., Pohl, J., Wang, B., Fu, H. and Liddington, R.C. (1998). 14-3-3zeta binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove. *J Biol Chem.* 26;273(26):16305-10
- Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hanel, F., and Eilers, M. (1997). An alternative pathway for gene regulation by Myc. *Embo J* 16, 5672-5686.
- Philipp, A., Schneider, A., Väsrik, I., Finke, K., Xiong, Y., Beach, D., Alitalo, K., and Eilers, M. (1994). Repression of Cyclin D1: a Novel Function of MYC. *Mol Cell Biol* 14, 4032-4043.
- Piluso, D., Bilan, P. and Capone, J.P. (2002) Host Cell Factor-1 Interacts with and Antagonizes Transactivation by the Cell Cycle Regulatory Factor Miz-1. *JBC* 277;48(29), 46799–46808
- Potter, T., Gohde, W., Wedemeyer, N., and Kohnlein, W. (2000). Keratinocytes exposed to ultraviolet radiation reveal three down-regulated genes with potential function in differentiation and cell cycle control. *Radiat Res* 154, 151-158.
- Queva, C., Hurlin, P. J., Foley, K. P., and Eisenman, R. N. (1998). Sequential expression of the MAD family of transcriptional repressors during differentiation and development. *Oncogene* 16, 967-977.
- Riggins, G.J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Thiagalingam, S. (1997). Frequency of Smad gene mutations in human cancers. *Cancer Res.* 1;57(13):2578-80.
- Reini, K., Uitto, L., Perera, D., Moens, P.B., Freire, R., Syväoja, J.E. (2004): TopBP1 localizes to centrosomes in mitosis and to chromosome cores in meiosis. *Chromsoma* 112: 323-330.
- Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L. C., Smerdon, S. J., Gamblin, S. J., and Yaffe, M. B. (1999). Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol Cell* 4, 153-166.

- Rommel, C., Radziwill, G., Lovric, J., Noeldeke, J., Heinicke, T., Jones, D., Aitken, A. and Moelling, K. (1996). Activated Ras displaces 14-3-3 protein from the amino terminus of c-Raf-1. *Oncogene* 1;12(3):609-19.
- Rowley, J.D. (1973). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1;243(5405):290-3.
- Shen, Y.H., Godlewski, J., Bronisz, A., Zhu, J., Comb, M.J., Avruch, J. and Tzivion, G. (2003). Significance of 14-3-3 self-dimerization for phosphorylation-dependent target binding. *Mol Biol Cell* 14(11):4721-33
- Schmidt, M, Fernandez de Mattos, S, van der Horst, A., Klompaker, R., Kops, G.J., Lam, E.W., Burgering, B.M. and Medema, R.H. (2002). Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol Cell Biol* 2(22):7842-52.
- Schulz, T.C., Hopwood, B., Rathjen, P.D. and Wells, J.R. (1995). An unusual arrangement of 13 zinc fingers in the vertebrate gene Z13. *J. Biochem. J.* 311 (1), 219-224
- Seimiya H., Sawada, H., Muramatsu, Y., Shimizu, M., Ohko, K., Yamane, K. and Tsuruo T., (2000). Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *EMBO J.* 19, 2652-2661
- Seoane, J., Pouponnot, C., Staller, P., Schader, M., Eilers, M. and Massague, J. (2001). TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. *Nat Cell Biol* 3(4):400
- Seoane, J., Le, H.V., Shen, L., Anderson, S.A. and Massague, J. (2004). Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell* 16;117(2):211-23.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A. and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235: 177-181.
- Smale, S.T. and Baltimore, D. (1989). The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 7;57(1):103-13.
- Staller, P., Peukert, K., Kiermaier, A., Seoane, J., Lukas, J., Karsunky, H., Moroy, T., Bartek, J., Massague, J., Hanel, F. and Eilers, M. (2001). Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. *Nat Cell Biol* 3(4):392-9.
- Stead, M.A., Trinh, C.H., Garnett, J.A., Carr, S.B., Baron, A.J., Edwards, T.A. and Wright, S.C. (2007). A beta-sheet interaction interface directs the tetramerisation of the Miz-1 POZ domain. *J Mol Biol* 2;373(4):820-6
- Stéhelin, D. (1976). The transforming gene of avian tumor viruses. *Pathol Biol (Paris)* 24(8):513-5.
- Takeda, O., Homma, C., Maseki, N., Sakurai, M., Kanda, N., Schwab, M., Nakamura, Y. and Kaneko, Y. (1994). There may be two tumor suppressor genes on chromosome arm 1p closely associated with biologically distinct subtypes of neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 10(1):30-9
- Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.
- Todd, A., Cossons, N., Aitken, A., Price, G.B. and Zannis-Hadjopoulos, M. (1998). Human cruciform binding protein belongs to the 14-3-3 family. *Biochemistry* 6;37(40):14317-25.
- Tommerup, N. and Vissing, H. (1995). Isolation and fine mapping of 16 novel human zinc finger-encoding cDNAs identify putative candidate genes for developmental and malignant disorders. *Genomics* 27, 259-264.

- Topp, W. C. (1981). Normal rat cell lines deficient in nuclear thymidine kinase. *Virology* 113, 408-411.
- Tumilowicz, J.J., Nichols, W.W., Cholon, J.J. and Greene, A.E. (1970). Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Res.* 30(8):2110-8.
- Tzivion, G., Luo, Z. and Avruch, J. (1998). A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature* 2;394(6688):88-92
- Tzivion, G., Luo, Z. J. and Avruch, J. (2000) Calyculin A-induced vimentin phosphorylation sequesters 14-3-3 and displaces other 14-3-3 partners in vivo. *J.Biol.Chem.* 275, 29772-29778
- Tzivion, G. Shen, Y.H. and Zhu, J. (2001). 14-3-3 proteins ; bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene* 20:6331-8
- Tzivion, G. and Avruch, J. (2002). 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem.* 1;277(5):3061-4
- Tzivion, G., Gupta, V.S., Kaplun, L. and Balan, V. (2006). 14-3-3 proteins as potential oncogenes. *Seminars in Cancer Biology* 16:203-213
- van Heusden, G.P. (2005). 14-3-3 proteins: regulators of numerous eukaryotic proteins. *IUBMB Life* 57(9):623-9 Review.
- van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Battle, E., Coudreuse, D. and Haramis, A. P. (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241-250.
- Waikel, R.L., Kawachi, Y., Waikel, P.A., Wang, X.J. and Roop, D.R. (2001). Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells. *Nat Genet.* 28(2):165-8
- Waldmann, T., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1995). p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Research*, 55.5187-5190
- Wang, B., Yang, H., Liu, Y.C., Jelinek, T., Zhang, L., Ruoslahti, E. and Fu, F. (1999). Isolation of High-Affinity Peptide Antagonists of 14-3-3 Proteins by Phage Display. *Biochemistry* 38 (38), 12499 -12504
- Wang, H., Iakova, P., Wilde, M., Welm, A., Goode, T., Roesler, W. J. and Timchenko, N. A. (2001). C/EBP-alpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Molecular Cell* 8: 817-828
- Wanzel, M., Kleine-Kohlbrecher, D., Herold, S., Hock, A., Berns, K., Park, J., Hemmings, B. and Eilers, M. (2005). Akt and 14-3-3eta regulate Miz1 to control cell-cycle arrest after DNA damage. *Nat Cell Biol.* 7(1):30-41
- Warner, B.J., Blain, S.W., Seoane, J. and Massague, J. (1999). Myc downregulation by transforming growth factor beta required for activation of the p15(Ink4b) G(1) arrest pathway. *Mol Cell Biol.* 19(9):5913-22.
- Weinberg, R.A. (1984). Ras Oncogenes and the molecular mechanisms of carcinogenesis. *Blood* 4(6):1143-5.
- Weiner, H. and Kaiser, W.M. (1999). 14-3-3 proteins control proteolysis of nitrate reductase in spinach leaves. *FEBS Lett.* 16;455(1-2):75-8.

- Wheeler-Jones C.P., Learmonth, M.P., Martin, H. and Aitken, A. (1996). Identification of 14-3-3 proteins in human platelets: effects of synthetic peptides on protein kinase C activation. *Biochem J.* 1;315 (1):41-7.
- Wu, K. J., Polack, A., and Dalla-Favera, R. (1999). Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC. *Science* 283, 676-679.
- Wu, S., Cetinkaya, C., Munoz-Alonso, M. J., von der Lehr, N., Bahram, F., Beuger, V., Eilers, M., Leon, J., and Larsson, L. G. (2003). Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene* 22, 351-360.
- Xie, G., Habbersett, R. C., Jia, Y., Peterson, S. R., Lehnert, B. E., Bradbury, E. M., and D'Anna, J. A. (1998). Requirements for p53 and the ATM gene product in the regulation of G1/S and S phase checkpoints. *Oncogene* 16, 721-736.
- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J. and Cantley, L.C. (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell* 26;91(7):961-71.
- Yaffe, M.B. (2002). How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett.* 20;513(1):53-7 Review
- Yamane, K., Wu, X., and Chen, J. (2002). A DNA damage-regulated BRCT-containing protein, TopBP1, is required for cell survival. *Mol Cell Biol* 22, 555-566.
- Yan, H., Dobbie, Z., Gruber, S.B., Markowitz, S., Romans, K., Giardiello, F.M., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (2001) Small changes in expression affect predisposition to tumorigenesis. *Nat Genet.* 30(1):25-6
- Yang, E. and Korsmeyer, S.J. (1996). Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood* 15;88(2):386-401.
- Zeng, Y. X., Somasundaram, K., and el-Deiry, W. S. (1997). AP2 inhibits cancer cell growth and activates p21WAF1/CIP1 expression. *Nat Genet* 15, 78-82.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 15;87(4):619-28.
- Zhang, W., Geiman, D.E., Shields, J.M., Dang, D.T., Mahatan, C.S., Kaestner, K.H., Biggs, J.R., Kraft, A.S. und Yang, V.W. (2001). The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. *J. Biol. Chem.* 16;275(24):18391-8.
- Zhao, N., Wang, J., Cui, Y., Guo, L. and Lu, S.H.J. (2004). Induction of G1 cell cycle arrest and P15INK4b expression by ECRG1 through interaction with Miz-1. *Cell Biochem.* 1;92(1):65-76.
- Ziegelbauer, J., Shan, B., Yager, D., Larabell, C., Hoffmann, B., and Tjian, R. (2001). Transcription factor MIZ-1 is regulated via microtubule association. *Mol Cell* 8, 339-349.
- Ziegelbauer J., Wei, J. and Tjian, R. (2004). Myc-interacting protein 1 target gene profile: a link to microtubules, extracellular signal-regulated kinase, and cell growth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 13;101(2):458-63

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

Sofern nicht hier aufgeführt, wurden Abkürzungen entsprechend den Maßangaben der IUPAC (*International union of pure and applied chemistry*) und denen des SI-Systems (*System Internationale de l'Unité*) verwendet. Spezielle Abkürzungen für Fachtermini, die nicht in dieser Liste enthalten sind, werden jeweils im Text erläutert.

A	Adenosin
A	Alanin
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AdML	Adenovirus Major Late
Ala	Alanin
α -	anti-
Amp	Ampicilin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	alternative reading frame
Arg	Arginin
Asp	Asparaginsäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM and Rad3-related
ATP	Adenosintriphosphat
B/HLH/LZ	Basische Region/Helix-Loop-Helix/Leuzinzippermotiv
bp	Basenpaare
β -Gal	β -Galaktosidase
BRCA	breast cancer associated
BRCT	BRCA1 C-Terminus-Domäne
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin

°C	Grad Celsius
Cdc	cell division cycle
Cdk	cyclin dependent kinase
cDNA	copy DNA
cfu	colony forming unit
ChIP	Chromatinimmunopräzipitation
Ci	Curie
Cip1	Cdk-Interacting Protein 1
CMV	Cytomegalovirus
CSB	Calf serum bovine
C-term	Carboxyl-Terminus
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidintriphosphat
dGTP	2'-Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidintriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
ECL™	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	Estrogen Receptor
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FLAG	Peptid-Epitop (DYKDDDDK)
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA

GFP	green fluorescent protein
Glu	Glutaminsäure
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
HBS	Hepes-gepufferte Salzlösung
HEPES	N2-Hydroxyethylpiperazin-N2-Ethansulfonsäure
HIV1	Human immunodeficiency virus type 1
HLH	Helix-Loop-Helix-Domäne
H2B-GFP	Histone-2B fusioniert zu EGFP
Ink4	inhibitor of kinase 4
INR	Initiatorelement
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactopyranosid
J	Joule
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kip	kinase inhibitory protein
Ktr.	Kontrolle
L	Leucin
l	Liter
LB	lysogeny broth Medium
Leu	Leucin
LTR	long terminal repeat
LZ	Leuzin-Zipper
m	milli
M	molar
max	maximal
MEF	Mausembryofibroblasten
min	Minute
Miz-1	Myc interacting zinc finger protein
MoMuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
Mops	N-Morpholino-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
Myc	Myelocytomatose Protein

Myr	Myristoylation
μ	mikro
n	nano
nm	Nanometer
NIH	National Institute of Health
NLS	nuclear localisation signal
NP40	Nonidet P-40
N-Term	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid
OHT	4-Hydroxytamoxifen
P-32	radioaktives Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly (C)	Polycytidylic acid
Poly (I)	Polyinosinic acid
POZ	Poxvirus und Zinkfinger-Domäne
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S	Serin
S-35	radioaktives Isotop des Schwefels
SDS	Sodiumdodecylphosphate
sec	Sekunde
Ser	Serin
SSC	sodium saline citrate
SV40	Simian Virus
T	Threonin
T	Thymidin

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Azetat/EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TE	Tris/EDTA (Puffer)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TERT	Telomerase reverse Transkriptase
TGF β	Transforming growth factor β
Thr	Threonin
TopBP	DNA TopoisomeraseII binding protein
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	volume/ volume (Volumen zu Volumen Verhältnis)
Wnt	Wingless-Type 1
WT	Wildtyp
w/v	weight/ volume (Gewicht zu Volumen Verhältnis)
z.B.	zum Beispiel
Zn	Zinkfinger

8.3 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

in Osnabrück

Altendorf, Bakker, Bakker-Grunwald, Bodenberger, Hurka, Jeserich, Junge, Kestler, Kratochwil, Lengeler, Lüken, Mummenhoff, Neuffer, Reuter, Scheibe, Schrempf, Schröpfer, Walder, Werries, Westheide, Wiczorek, Zielke

8.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei allen bedanken, die in wissenschaftlicher so wie motivierender Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dabei gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. Martin Eilers, in dessen Labor ich die Gelegenheit hatte, ein sehr interessantes Thema zu bearbeiten und diese Arbeit anzufertigen. Die unentwegte Unterstützung, sowie die zahlreichen Anregungen und die interessanten Diskussionen haben maßgeblich zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen.

Ein großes Dankeschön geht an Michael Wanzel und Steffi Herold für die Zusammenarbeit auf dem 14-3-3 Projekt. Euer Teamgeist und eure Unterstützung haben die Arbeit an diesem Projekt sehr bereichert und ich konnte von euren Erfahrungen noch einiges lernen.

Bei Steffi möchte ich mich auch ganz herzlich bedanken, daß sie sich die Zeit genommen hat, meine Arbeit zu lesen und zu diskutieren.

Caroline Bouchard möchte ich für zahlreiche inspirierende Diskussionen, viele technische Tips und ihre Gesellschaft an langen Laborabenden danken. Merci beaucoup!

Prof. Dr. Hans-Peter Elsässer möchte ich für die Einführung in die Arbeit mit dem Konvokalmikroskop und Prof. Dr. Dr. Jürgen Daut für das zur Verfügung stellen von 14-3-3 Expressionsplasmiden danken.

Mein Dank gilt zudem Michael Neuhaus und Bianca Jebavy für die technische Unterstützung und Hilfestellung bei Klonierungsarbeiten und Westernblot Analysen.

Für das angenehme Arbeitsklima, für die gute Zusammenarbeit und für die vielen schönen und kreativen außerlaborlichen Aktivitäten möchte ich dem Eilers-Labor Danke sagen: Caroline Bouchard, Steffi Herold, Michael Wanzel, Bernd Berwanger, Eckard Bergmann, Sebastian Horn, Sovana Adhikary, Sandra Bernard, Vincent Beuger,

Sven Gallinat, Judith Marquard, Till Kortüm, Viola Paul, Andreas Hock, Antje Grzeschiczek, Werner Lutz, Mona Meyer, Michael Neuhaus, Inge Pelz, Jens-Peter Reese, Katrin Nowak und Tobias Otto.

Einen letzten und sehr herzlichen Dank möchte ich auch meinem Freund und meiner Familie sagen, die mich moralisch unterstützt haben.

8.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Identifizierung von Inhibitoren der Wachstumsarrest induzierenden Funktion von Miz1 und Identifizierung und Charakterisierung von 14.3.3eta als Inhibitor der Funktion von Miz1“

am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. Martin Eilers ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde zum wesentlichen wie folgt veröffentlicht:

Originalarbeiten:

Wanzel*, M., Kleine-Kohlbrecher*, D., Herold, S*., Hock, A., Berns, K., Krause, M., Samans, B., and Eilers, M., (2003). An Akt/14-3-3 signaling pathway regulates Miz1 to control gene expression and cell cycle arrest upon DNA damage. *Nat Cell Biol.* 7(1):30-41

* gleicher Beitrag der Autoren

Übersichtsartikel:

D. Kleine-Kohlbrecher, S. Adhikary and M. Eilers (2005). *Mechanisms of Transcriptional Repression by Myc*. The Myc/Max/Mad Transcription Factor Network, R.N. Eisenman (Editor), Springer Verlag.

Kongressbeiträge :

Poster :

"Chromatin assembly and inheritance of functional states", Transregio 5 Symposium, October 9-11, 2003, München

Poster: Daniela Kleine-Kohlbrecher, Michael Wanzel and Martin Eilers: *Regulation of Miz1 function by 14-3-3 eta*

„Genes & Cancer 2004“ –21th Meeting, Dezember 13-15, 2004, University of Warwick

Poster: Daniela Kleine-Kohlbrecher, Michael Wanzel, Steffi Herold and Martin Eilers: *An Akt/ 14-3-3 signaling pathway regulates Miz1 to control cell cycle arrest upon DNA damage*

Vorträge :

"Oncogenes & growth control", EMBL/Salk/EMBO Konferenz, April 17-20, 2004, EMBL Heidelberg

Vortrag : *An Akt/14-3-3 signaling pathway regulates Miz1 to control gene expression and cell cycle arrest upon DNA damage*

Kopenhagen, den 30. April 2008

Daniela Kleine-Kohlbrecher